

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLÁUDIA REGINA BOSA

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. Tyzzer, 1907 EM  
FEZES DE ANIMAIS E EM ÁGUA DO ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA,  
PARANÁ, BRASIL**

CURITIBA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Cryptosporidium* spp. Tyzzer, 1907 EM  
FEZES DE ANIMAIS E EM ÁGUA DO ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA,  
PARANÁ, BRASIL**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Oliveira Costa

CURITIBA  
2014

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Bosa, Cláudia Regina

Detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp Tyzzer, 1907 em fezes de animais e em água do Zoológico Municipal de Curitiba, Paraná, Brasil. / Cláudia Regina Bosa. – Curitiba, 2014.

109 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Edilene Alcântara de Castro

Co-orientadora: Adriana Oliveira Costa

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Zoonoses 2. Saúde Pública 3. Protozoário I. Título II. Castro, Edilene Alcântara de III. Costa, Adriana Oliveira IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 614.56



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**"Detecção e identificação de *Cryptosporidium* spp. Tyzzer, 1907  
em fezes de animais e em água do Zoológico Municipal de  
Curitiba, Paraná, Brasil"**

Por

**CLAUDIA REGINA BOSA**

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,  
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos  
professores:**

  
**Profª. Drª. Edilene Alcântara de Castro (presidente)**

  
**Profª. Drª. Gertrud Müller Antunes**

  
**Profª. Drª. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro**

  
**Prof. Dr. Alexander Welker Biondo**

  
**Profª. Drª. Rosângela Clara Paulino**

**Curitiba, 30 de setembro de 2014.**

Dedico este trabalho

A minha filha amada Maria Luiza, pelo seu amor incondicional e alegria de todos os dias.

A minha mãe Cândida, pelo carinho e auxílio em todos os momentos, principalmente nas minhas ausências.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado serenidade, conforto e saúde para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela oportunidade em poder aprimorar meus estudos.

Ao Corpo docente do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pelas aulas apaixonantes e pela amizade.

À Professora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edilene Alcântara de Castro, por me aceitar como sua aluna, pelo respeito e acima de tudo por servir como exemplo para a minha vida profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Oliveira Costa por me iniciar no mundo das técnicas moleculares, pela amizade, dedicação, chamadas de atenção, pela paciência, por me receber em sua casa e também pela sua retidão de caráter, mais um exemplo profissional a ser seguido.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magda Costa Ribeiro, pela amizade, conselhos, apoio e simpatia de sempre.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giseli Klassen pela dedicação sem igual para com todos os alunos e pelo auxílio na realização deste trabalho, principalmente nos ensaios de sequenciamento das amostras.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosângela C. Paulino, pelos conselhos, amizade e empréstimos de literaturas.

Aos amigos do mestrado e doutorado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, em especial: Juliana Seger, Déberli Ruiz Fernandes, Sandra “Sandrinha”, André Gonçalves, Liliane Klassen, Alessandra Becker Finco, Maurício Baum.

Ao meu companheiro de todos os momentos Dr. Vinícius Abilhoa pelo carinho, incentivo, amor, tolerância, por entender minhas constantes ausências, muito obrigada, se este trabalho se finaliza você tem grande participação nisso.

Ao Dr. Marcos Elias Traad da Silva por permitir a realização deste trabalho no Zoológico Municipal de Curitiba e ao meu chefe direto e amigo Juan Ramon Soto Franco.

Ao Alfredo Vicente de Castro Trindade por apoiar este projeto enquanto Diretor do Departamento de Pesquisa e Conservação da Fauna da Secretaria Municipal do Meio Ambiente.

Aos tratadores que auxiliaram nas coletas de fezes e água e que foram meus guarda-costas, em especial aos queridos “Tamandaré” e “Paulo Cabana”.

A equipe da Divisão de Educação para a Conservação da Fauna, por me apoiar e suprir minhas ausências. Muito obrigada a Cris, Dani, Fernando e Lu Popp e a todos os queridos estagiários.

A farmacêutica e bioquímica Cynthia Castro Correa Malaghini, da Unidade de Serviço de Avaliação de Conformidades (USAV) da SANEPAR pela realização de parte das análises físicas, químicas e biológicas da água coletada neste estudo.

A Fundação Araucária e ao CNPq por darem suporte financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
3.1. BREVE HISTÓRICO DA CRIPTOSPORIDIOSE.....	5
3.2. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	6
3.3. BIOLOGIA .....	10
3.4. ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENIA.....	13
3.5. PATOGENIA, SINTOMATOLOGIA E TRATAMENTO .....	16
3.6. DIAGNÓSTICO PARA <i>Cryptosporidium</i> .....	18
3.7. EPIDEMIOLOGIA E PREVENÇÃO .....	22
3.8. CRIPTOSPORIDIOSE EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO E CRIAÇÃO .....	27
3.9. CRIPTOSPORIDIOSE EM ANIMAIS SILVESTRES .....	28
3.10. CRIPTOSPORIDIOSE EM ANIMAIS MANTIDOS EM CENTROS DE TRIAGEM E ZOOLOGICOS DO MUNDO .....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	35
4.2. COLETA DAS AMOSTRAS DE FEZES .....	38
4.3. COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	41
4.4. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	44
4.4.1. Amostras de oocistos usados como controle positivo e de fezes.....	44



4.4.2. Amostras de água .....	45
4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR .....	46
4.5.1. Extração de DNA.....	46
4.5.2. PCR1 .....	47
4.5.3. <i>Nested</i> – PCR para detecção de <i>Cryptosporidium</i> .....	47
4.5.4. PCR2.....	47
4.5.5. Eletroforese .....	48
4.6. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO .....	48
4.7. SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS .....	49
4.8. ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO.....	49
4.9. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL .....	52
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
5.1. DETECÇÃO DE <i>Cryptosporidium</i> EM FEZES DE ANIMAIS.....	53
5.1.1. Coloração de Ziehl-Neelsen modificada.....	53
5.1.2. PCR e N-PCR .....	54
5.2. DETECÇÃO DE <i>Cryptosporidium</i> EM ÁGUA DO PARQUE .....	55
5.2.1. Parâmetros físicos, químicos e biológicos das amostras de água. ....	55
5.2.2. Detecção de <i>Cryptosporidium</i> pela coloração de Ziehl-Neelsen modificada e PCR.....	57
5.3. ANÁLISE DO GENÓTIPO PELO SEQUENCIAMENTO DO GENE 18S rDNA .....	58
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>72</b>
<b>8. PERSPECTIVAS E RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>102</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. A - ASPECTO GERAL DE UM REPRESENTANTE DO FILO APICOMPLEXA. B – ESTRUTURA DO COMPLEXO APICAL .....07
- FIGURA 2. OOCISTOS DE *Cryptosporidium* 1000X. A – COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA. B – OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA EM CONTRASTE DE FASE. C – IMUNOFLOURESCÊNCIA. ....08
- FIGURA 3. CICLO BIOLÓGICO DE *Cryptosporidium* NOS ENTERÓCITOS. ....11
- FIGURA 4. ÁRVORE FILOGENÉTICA HIPOTÉTICA DO GRUPO APICOMPLEXA. OS TRÊS PRINCIPAIS GRUPOS PARASITOS ESTÃO EM CORES E SEU CICLO DE VIDA INDICADO, BEM COMO *Cryptosporidium* O QUAL EMERGE DAS GREGARINAS. O NÚMERO DE RAMOS E SUA ESPESSURA INDICAM DIVERSIDADE (NÚMERO DE ESPÉCIES) .....15
- FIGURA 5. AGENTES CAUSADORES DE DIARREIA SEVERA EM CRIANÇAS NO MUNDO. ....16
- FIGURA 6. DESCRIÇÃO DOS MODOS DE TRANSMISSÃO DE *Cryptosporidium*. APÓS A INGESTÃO (OU INALAÇÃO) POR UM HOSPEDEIRO SUSCETÍVEL, OCORRE O DEENCISTAMENTO (1). OS ESPOROZOÍTOS LIBERADOS INVADEM AS CÉLULAS EPITELIAIS DO TRATO GASTROINTESTINAL OU OUTROS TECIDOS, COMPLETANDO O CICLO PRODUZINDO OOCISTOS QUE SAEM DO HOSPEDEIRO (2) E SÃO LIBERADOS NO AMBIENTE (3). A TRANSMISSÃO DE *Cryptosporidium* OCORRE PRINCIPALMENTE POR INGESTÃO DE ÁGUA CONTAMINADA, ALIMENTOS E CONTATO PESSOA-A-PESSOA (4). A TRANSMISSÃO ZOONÓTICA DE *Cryptosporidium parvum* OCORRE POR MEIO DA EXPOSIÇÃO A ANIMAIS INFECTADOS OU CONTATO COM ÁGUA CONTAMINADA POR FEZES DESSES ANIMAIS. ....25
- FIGURA 7. FATORES AMBIENTAIS E SOCIAIS QUE INFLUENCIAM A INCIDÊNCIA DE GIARDÍASE E CRIPTOSPORIDIOSE. DETERMINANTES DISTAIS INFLUENCIAM DETERMINANTES PROXIMAIS QUE POR SUA VEZ MODIFICAM O CICLO DE TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE MANEIRA QUE PODEM ALTERAR SEU RISCO. O CICLO DE TRANSMISSÃO DA DOENÇA INCLUI ANIMAIS HOSPEDEIROS E RESERVATÓRIOS AMBIENTAIS. INTERVENÇÕES FUNCIONAM EM MÚLTIPLOS NÍVEIS: ECOLÓGICAS E SOCIAIS PARA REDUZIR A CARGA DE PATÓGENOS NO AMBIENTE, MUITAS VEZES AO NÍVEL GLOBAL (POR EXEMPLO, AS POLÍTICAS DE USO DA TERRA ATENUAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS), DE SAÚDE PÚBLICA PARA REDUZIR A EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO A ELEMENTOS PATOGÊNICOS E NÍVEL INDIVIDUAL, INTERVENÇÕES CLÍNICAS

(CUIDADOS EM SAÚDE PRIMÁRIA E SERVIÇOS DE DIAGNÓSTICOS). .....	26
FIGURA 8. MAPA DA CIDADE DE CURITIBA, A SETA INDICA O PARQUE IGUAÇU, NO QUAL ESTÁ SITUADO O ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA.....	36
FIGURA 9. ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA. A- RECINTOS AMPLOS. B- DIETA DOS ANIMAIS. C-HIGIENIZAÇÃO DOS RECINTOS. D- RECINTO COM AMPLA COBERTURA VEGETAL. E/F. RECINTOS MENORES. G- PONTO DE ÁGUA. H/I- SETOR EXTRA. ....	37
FIGURA 10. AS MARCAÇÕES IDENTIFICAM OS LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA NO ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA: 1- RECINTO DOS CERVOS-NOBRE. 2- RECINTO DAS LONTRAS. 3- RECINTO DAS AVES AQUÁTICAS. 4- LAGOA DO SAPATÃO. 5- RECINTO DOS MACACOS-ARANHA. 6- RECINTO DOS MACACOS-PREGO. A LINHA LARANJA MOSTRA O TRAJETO DAS ÁGUAS DO RIO IGUAÇU NO INTERIOR DO PARQUE. ....	42
FIGURA 11. FOTO DOS PONTOS DE COLETA DE ÁGUA. A- COLEÇÃO AQUÁTICA (RECINTO DOS CERVOS-NOBRE). 1. B- COLEÇÃO AQUÁTICA 2 (RECINTO DAS LONTRAS). C- COLEÇÃO AQUÁTICA 3 (RECINTO DAS AVES AQUÁTICAS). D- COLEÇÃO AQUÁTICA 4 (LAGOA DO SAPATÃO). E- COLEÇÃO AQUÁTICA 5 (RECINTO DOS MACACOS-ARANHA). F- COLEÇÃO AQUÁTICA 6 (RECINTO DOS MACACOS-PREGO). ....	43
FIGURA 12. FLUXOGRAMA LISTANDO AS DIVERSAS FORMAS DE CONSTRUÇÕES FILOGENÉTICAS. ....	51
FIGURA 13. RESUMO ESQUEMÁTICO DOS MODELOS SEGUIDOS PARA A REALIZAÇÃO DA ANÁLISE FILOGENÉTICA BAYESIANA. ....	52
FIGURA 14. ESPÉCIES DE AVES DA FAMÍLIA PSITTACIDAE IDENTIFICADAS COMO POSITIVAS PARA INFECÇÃO POR <i>C. galli</i> . A- ARARAJUBA ( <i>Guaruba guarouba</i> ). B- PAPAGAIO-DE-PEITO-ROXO ( <i>Amazona vinacea</i> ). C- PAPAGAIO-DE-CARA-ROXA ( <i>Amazona brasiliensis</i> ). ....	54
FIGURA 15. GEL DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO FRAGMENTO CONTENDO 826 A 864 PARES DE BASES AMPLIFICADO POR PCR UTILIZANDO OS INICIADORES XIAOn F E R PARA O GENE 18S rDNA DE <i>Cryptosporidium</i> DAS AMOSTRAS DE FEZES DE AVES. 1. ARARAJUBA ( <i>Guaruba guarouba</i> ), 2. PAPAGAIO-DA-CARA-ROXA ( <i>Amazona brasiliensis</i> ), 3. PAPAGAIO-DA-CARA-ROXA ( <i>A. brasiliensis</i> ), 4. PAPAGAIO-DE-PEITO-ROXO ( <i>A. vinacea</i> ). PM – 100 PB. ....	55
FIGURA 16. GEL DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO O PRODUTO AMPLIFICADO PELA PCR DAS AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZANDO	

OS INICIADORES XIAO<sub>n</sub> R E F PARA O GENE 18S rDNA DE *Cryptosporidium*, NOS QUAIS OBTIVE-SE AMPLICONS DE 826 A 864 PB.1, 2 E 3. LAGOA DO SAPATÃO, 4. ÁGUA ULTRAPURA CONTAMINADA COM 10<sup>4</sup> OOCISTOS. 5. AMOSTRA DE ÁGUA ULTRAPURA CONTAMINADA COM 10<sup>3</sup> OOCISTOS. PM – 100 pb. CP (CONTROLE POSITIVO), CN (CONTROLE NEGATIVO). .....57

FIGURA 17. RELAÇÃO EVOLUTIVA DOS ISOLADOS DE *Cryptosporidium* sp. DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 18SSU rDNA, PROVENIENTES DE FEZES DE AVES E ÁGUA DOS RECINTOS DO ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA. EM ÁGUA: CRYP1. EM AVES POR: CRYP. 2, CRYP. 3, CRYP. 4 E CRYP. 5. CONTROLE POSITIVO CRYP. *C. parvum* (GENBANK Nº AF093490.1). *C. galli* (GENBANK Nº EU543268.1). GRUPO EXTERNO – *Eimeria tenella* .....58

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1. ESPÉCIES DE <i>Cryptosporidium</i> , DIMENSÃO DOS OOCISTOS, LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA NO HOSPEDEIRO E HOSPEDEIRO DOMINANTE .....	09
QUADRO 2. SURTOS DE CRIPTOSPORIDIOSE REGISTRADOS ASSOCIADOS AOS ALIMENTOS.....	24
QUADRO 3. PREVALÊNCIA DE <i>Cryptosporidium</i> EM ANIMAIS SILVESTRES, EM DIVERSAS RESERVAS E PARQUES DE VIDA LIVRE DO MUNDO. SÃO IDENTIFICADOS O LOCAL DE COLETA DAS AMOSTRAS FECAIS, MÉTODOS UTILIZADOS E RESULTADOS OBTIDOS .....	29
TABELA 1. GRUPOS DE MAMÍFEROS DOS QUAIS AS AMOSTRAS FECAIS FORAM COLETADAS .....	38
TABELA 2. GRUPOS DE AVES DAS QUAIS AS AMOSTRAS FECAIS FORAM COLETADAS .....	40
TABELA 3. RESULTADO DAS AMOSTRAS DE FEZES DE MAMÍFEROS E AVES DO ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA, POSITIVAS PELAS TÉCNICAS DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA, PCR1, N-PCR E PCR2.....	53
TABELA 4. PARÂMETROS FÍSICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS ANALISADOS NAS COLEÇÕES AQUÁTICAS AMOSTRADAS DO ZOOLOGICO MUNICIPAL DE CURITIBA .....	56

## RESUMO

O protozoário *Cryptosporidium* pertence ao filo Apicomplexa. Possui capacidade de infectar todas as classes de vertebrados (aquáticos, aéreos, terrestres), inclusive o ser humano. Atualmente, são reconhecidas vinte e uma espécies de *Cryptosporidium* e aproximadamente 40 genótipos foram identificados. A infecção ocorre por meio da ingestão de oocistos liberados infectantes nas fezes dos hospedeiros. Algumas espécies apresentam potencial zoonótico, como *C. parvum* e *C. meleagridis*. *Cryptosporidium* causa diarreia, normalmente com cura espontânea, sendo mais grave em indivíduos imunodeprimidos ou portadores de doenças autoimunes. As coleções de água potável e de recreação são as principais fontes de infecção. Em países desenvolvidos faz-se o monitoramento da água, para consumo, distribuída à população, porém naqueles em desenvolvimento o mesmo não ocorre e a doença é considerada negligenciada. No mundo poucos trabalhos são encontrados tratando da prevalência e dinâmica da transmissão da criptosporidiose em zoológicos, os quais apresentam singularidades que facilitam este tipo de estudo, apesar do fato de os animais não estarem em seus habitats naturais. No Brasil, não existem estudos em zoológicos contemplando a detecção de *Cryptosporidium* em fezes de animais e nas águas dos lagos presentes nestes ambientes. O objetivo do presente trabalho foi verificar a presença de *Cryptosporidium* em fezes de aves e mamíferos e nas águas dos recintos e lagos do Zoológico Municipal de Curitiba. No período de março/2011 a dezembro/2011, 249 amostras fecais (121 de aves e 128 de mamíferos) foram coletadas e processadas para detecção, identificação morfológica e molecular. As fezes foram filtradas, sedimentadas e submetidas ao protocolo de purificação em solução saturada de NaCl. O material foi analisado por meio da técnica de Ziehl-Neelsen modificada e processado para extração de DNA e detecção por PCR e Nested PCR. Amostras de seis coleções aquáticas (três em cada coleção, N=18) também foram coletadas para análise. A água foi filtrada em membrana de acetato-celulose e o eluato obtido foi processado para a realização da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada, e detecção molecular do parasito por PCR e nested PCR, usando iniciadores para a região hiper-variada do gene 18SSU rDNA. Das amostras fecais analisadas, duas foram positivas para a coloração de Ziehl-Neelsen modificada sendo uma de ararajuba (*Guaruba guarouba*) e outra de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*). A Nested PCR foi positiva nas duas amostras anteriores e em uma terceira, proveniente de outro papagaio-da-cara-roxa. O material de um quarto animal, um papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), também foi positivo na PCR de primeira etapa. Das coleções aquáticas amostradas uma apresentou positividade em duas das três amostras coletadas. O registro de *Cryptosporidium* nestas aves é o primeiro na literatura mundial. Os isolados obtidos foram sequenciados. A espécie *C. galli* foi identificada nas amostras provenientes de aves e *C. parvum* nas amostras provenientes de coleções aquáticas e para o controle de referência. Uma árvore filogenética utilizando análise Bayesiana foi construída e nela os isolados identificados ficaram em um mesmo ramo, com um bom suporte, já o controle ficou no mesmo grupo da sequência de *C. parvum* do GenBank. Estes resultados indicam similaridade dos isolados encontrados. Conclui-se que o presente trabalho poderá servir como subsídio para a ambientação dos recintos e para o manejo dos animais, principalmente no que se refere ao contato com as águas do ambiente para a saúde dos animais, dos trabalhadores e visitantes do zoológico, devido à identificação de uma espécie de potencial zoonótico *C. parvum*.

Palavras-chave: Zoonoses; Saúde Pública; Animais Silvestres; protozoários.

## ABSTRACT

The *Cryptosporidium* protozoan belongs to the phylum Apicomplexa. It is capable of infecting all vertebrate classes (aquatic, aerial, and terrestrial), including humans. Currently, twenty one species of the genus *Cryptosporidium* are recognized, and approximately 40 genotypes were identified. Infection occurs through the ingestion of infected oocysts released in the feces of the hosts. Some species have zoonotic potential, such as *C. parvum* and *C. meleagridis*. *Cryptosporidium* causes diarrhea, usually with spontaneous cure, being more worrisome in immunocompromised individuals or patients with autoimmune diseases. The collections of drinking water and recreation are the main sources of infection. In developed countries the drinking water supplied to the population is monitored for this pathogen, however the same does not occur in developing countries where the disease is considered neglected. In the world few studies dealing with the prevalence and transmission dynamics of cryptosporidiosis in zoos are found. These spaces have singularities that facilitate this type of study, despite the fact that animals are not in their natural habitats. In Brazil, there are no studies in these environments contemplating cryptosporidiosis. This work aims to verify *Cryptosporidium* infection in captive birds and mammals, and also in the water bodies and pounds in the enclosures of the Municipal Zoo of Curitiba. From March 2011 to December 2011, 249 fecal samples, 121 birds and 128 mammals were collected and processed for morphological and molecular identification of *Cryptosporidium*. Feces were filtered, pelleted and subjected to the purification protocol in saturated NaCl solution. Samples were analyzed following Ziehl-Neelsen modified technique, and processed for DNA extraction and detection by PCR and Nested PCR. Water samples from six sites (three in each site, N=18) were also collected for analysis. The water was filtered through a cellulose-acetate membrane and the eluate obtained was processed by Ziehl-Neelsen modified technique, followed by the molecular detection through PCR and Nested PCR, using primers for the hyper-diverse region of the rDNA gene 18SSU. Two fecal samples were positive on microscopy for *Cryptosporidium*: one from Golden Parakeet (*Guaruba guarouba*) and other from Red-tailed Amazon (*Amazona brasiliensis*). The Nested PCR was positive for the two previous samples and also in a third from another Red-tailed Amazon. The material of a fourth animal, Vinaceous Amazon (*Amazona vinacea*), was also positive in PCR first step. For the water collection, one was positive in two of the three samples. The record of *Cryptosporidium* in these birds is the first in the world literature. The isolates obtained were sequenced. The species *C. galli* was identified for isolates from birds and *C. parvum* isolate derived for the collection of water and the control reference. A phylogenetic tree was constructed using Bayesian analysis, where the isolates identified in this study clustered in the same branch, with good support, since the control group was the same sequence of *C. parvum* from GenBank. These results indicate similarity of isolates found. We conclude that this study can serve as input to the ambiance of the grounds and for the handling of animals, especially with regard to contact with the waters of the environment for the animals' health, workers and visitors to the zoo, due to identifying a kind of *C. parvum* zoonotic potential.

Keywords: Zoonoses, Public Health; Wild Animals; Protozoa.

## 1. INTRODUÇÃO

O protozoário intestinal do gênero *Cryptosporidium* é um parasito do Filo Apicomplexa e pode ser encontrado em humanos, animais domésticos e silvestres, podendo infectar praticamente todas as espécies de vertebrados. A veiculação hídrica é considerada uma das principais formas de disseminação de *Cryptosporidium*. Há maior destaque para a água de beber, seguida das águas de recreação, com relato de surtos de criptosporidiose de veiculação hídrica em vários países (SMITH & NICHOLS, 2010; BRIGGS *et al.*, 2014; WIDERSTRON *et al.*, 2014; ONICHANDRAM *et al.*, 2014). As formas de resistência de *Cryptosporidium* são os oocistos, que são liberados com as fezes do hospedeiro, já infectantes. De acordo com estudos de Okhuysen *et al.* (1999) que conduziram infecções experimentais em humanos voluntários, a dose infectante pode ser de 9 a 1000 oocistos, aproximadamente. A criptosporidiose é considerada uma doença negligenciada e sua ocorrência está intimamente relacionada com as questões de saneamento básico e higiene. A maioria dos indivíduos infectados não é diagnosticada, e indivíduos imunocompetentes apresentam diarreia autolimitada, muitas vezes sem causa elucidada. Porém, em indivíduos imunodeprimidos a criptosporidiose pode tornar-se crônica e grave devido à considerável perda de líquidos e desidratação, principalmente, naqueles acometidos por SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida).

Em animais de criação, a criptosporidiose também é reconhecida como problema importante, especialmente em animais jovens, se apresenta mais grave levando a significativas perdas na produção (NEMEJC *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2014; KAUPKE *et al.*, 2014, RIEUX *et al.*, 2014). Nessa situação, cada animal pode eliminar de 100 a  $1,7 \times 10^7$  oocistos por grama de fezes (RIEUX *et al.*, 2014). A alta produção de oocistos eliminados aliada à veiculação hídrica e a existência de espécies de *Cryptosporidium* que afetam tanto os animais, quanto o ser humano, contribuem para aumentar o risco de surtos entre a população humana. Como exemplo, pode ser citado o surto de criptosporidiose ocorrido em Milwaukee (EUA) no ano de 1993. A rota de transmissão epidêmica nunca foi oficialmente identificada, mas suspeita-se que o surto tenha sido causado por *Cryptosporidium* proveniente de gado bovino. MAC KENZIE *et al.* (1994) mostraram que neste surto oocistos de



*Cryptosporidium* não foram retidos pelo processo de filtração empregado na estação de tratamento de água da cidade, devido à contaminação por esgoto, proveniente de uma estação de tratamento de esgoto no Lago Michigan. Esta condição de contaminação da água durou de 23 de março a 8 de abril, neste período, 403 mil pessoas foram infectadas e apresentaram sintomas como dor no estômago, diarreia, febre e desidratação. Estimaram-se aproximadamente 104 mortes, a maioria de pessoas imunodeprimidas, como as portadoras de SIDA (HOXIE *et al.*, 1997). Vários trabalhos trazem relatos de surtos de criptosporidiose no mundo, comprovando sua importância como doença emergente (BALDURSSON & KARANIS, 2011).

Além da reconhecida importância em animais de criação, a criptosporidiose também tem sido estudada em animais silvestres, embora sejam poucos os estudos de ocorrência da parasitose tanto naqueles que vivem livres em seu habitat natural quanto nos mantidos em cativeiro (MEIRELES *et al.*, 2007; HILL *et al.*, 2008; FENG, 2010; VAN *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2011; RAVASZOVA *et al.*, 2012; ABU SAMRA *et al.*, 2013). Frequentemente, as doenças em animais silvestres são consideradas de interesse somente se a saúde humana ou produção agrícola são afetados diretamente. No caso da criptosporidiose, a possibilidade de transmissão do parasito dos animais para os seres humanos justifica a necessidade do conhecimento da prevalência e dinâmica de transmissão em animais silvestres. Além disso, a criptosporidiose em animais livres e de cativeiro pode comprometer a saúde destes hospedeiros, especialmente por afetar de forma mais intensa os indivíduos jovens, tornando-se, portanto, motivo de preocupação em unidades naturais e artificiais de conservação da vida silvestre.

Em zoológicos, onde os animais são mantidos em recintos, a ocorrência de doença como a criptosporidiose é favorecida pelo contato mais próximo dos indivíduos. O conhecimento da prevalência e da dinâmica de transmissão do parasito nestes animais é importante para estabelecer medidas de prevenção e manejo adequados para evitar ou minimizar surtos. Além disso, a possibilidade de transmissão zoonótica pode ser inferida a partir do conhecimento dos genótipos de *Cryptosporidium* prevalentes nos vários hospedeiros: animais e humanos. Apesar da relevância de estudos nesse sentido, há poucos trabalhos que tratam da detecção de *Cryptosporidium* em zoológicos (HEUSCHELE *et al.*, 1986; GOMEZ *et al.*, 1992; GOMEZ *et al.*, 1996; GOMEZ *et al.*, 2000; GRACENEA *et al.*, 2002; RYAN *et al.*,

2003a; ALVES *et al.*, 2005; MATSUBAYASHI *et al.*, 2005; ROHELA *et al.*, 2005; VENTURINI *et al.*, 2006; LIM *et al.*, 2008; PÉREZ CORDÓN *et al.*, 2008; GEURDEN *et al.*, 2009; FAGIOLINI *et al.*, 2010; KODÁDKOVÁ *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011; PAPINI *et al.*, 2012).

O Zoológico Municipal de Curitiba está situado na Bacia Hidrográfica do Rio Iguaçu, sendo margeado por suas águas. Devido à importância da Bacia do Iguaçu para o abastecimento industrial, bem como da população, estudos que tratem da contaminação desta água, por águas servidas, são importantes para a identificação de pontos de contaminação e também para planejar estratégias de prevenção de surtos de criptosporidiose, como os relatados nos últimos anos (FAYER, 2004; KARANIS *et al.*, 2007; PUTIGNANI & MENCHELLA, 2010; LAL *et al.*, 2013). É importante ressaltar que a água servida dos recintos dos animais mantidos em cativeiro no Zoológico Municipal de Curitiba é escoada no ambiente e atinge o Rio Iguaçu, podendo contaminar os mananciais de abastecimento. Considerando tal possibilidade, a avaliação da ocorrência de *Cryptosporidium* nos animais e no ambiente do Zoológico Municipal de Curitiba é um estudo contribui para dimensionar o potencial de contaminação, por *Cryptosporidium* originada do zoológico, na água de consumo fornecida para diversas cidades do Estado do Paraná, incluindo municípios da região metropolitana de Curitiba (SEMA, 2010). Adicionalmente, os dados obtidos podem auxiliar nas questões de manejo dos animais e na arquitetura dos recintos para evitar a transmissão entre os animais e, eventualmente, para os tratadores, demais profissionais do zoológico e público visitante.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Pesquisar *Cryptosporidium* nas amostras fecais dos animais de cativeiro e nas coleções aquáticas dos recintos do Zoológico Municipal de Curitiba, situado no Parque Municipal do Iguaçu.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a ocorrência de *Cryptosporidium* em fezes de animais de cativeiro e na água dos lagos do Zoológico Municipal de Curitiba por meio de técnica microscópica e molecular.
- b) Identificar espécies/genótipos de *Cryptosporidium* presentes nas fezes dos animais e coleções aquáticas dos recintos pelo sequenciamento do gene 18SSU rRNA.
- c) Realizar a análise filogenética dos isolados baseada no marcador genético 18 SSU rRNA.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. BREVE HISTÓRICO DA CRIPTOSPORIDIOSE

O parasito *Cryptosporidium* foi observado pela primeira vez em laboratório pelo parasitologista Ernest Edward Tyzzer, no tubo digestório de camundongos, no ano de 1907. Três anos mais tarde Tyzzer nominou-o como *Cryptosporidium muris* (TYZZER, 1907; TYZZER, 1910 *apud* FAYER & UNGAR, 1986). Em 1912, o mesmo pesquisador identificou a espécie *Cryptosporidium parvum*, encontrada no intestino delgado de camundongos.

A partir de 1955, o *Cryptosporidium* passou a despertar interesse dos cientistas com a descrição de uma nova espécie - *Cryptosporidium meleagridis* - a qual foi associada a infecções letais em perus (*Meleagris ocellata*) (SLAVIN, 1955). O maior interesse da medicina veterinária por *Cryptosporidium* ocorreu em 1971, quando a espécie *Cryptosporidium parvum* passou a ser associada a episódios de diarreia em bovinos (PANCIERA *et al.*, 1971).

Os primeiros casos de criptosporidiose em humanos foram registrados em 1976 nos Estados Unidos da América. Foi descrito um caso de criptosporidiose em uma criança imunocompetente com três anos de idade (NIME, *et al.*, 1976) e ainda um quadro de criptosporidiose em um paciente submetido à terapia imunossupressora (MEISEL *et al.*, 1976).

A criptosporidiose passou a ser considerada importante somente no início dos anos oitenta, quando oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados nas fezes de indivíduos infectados com o vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Antes do início da terapia antirretroviral 24 % dos portadores de SIDA apresentavam diarreia causada por este parasito (DILLINGHAM *et al.*, 2002).

Os primeiros relatos sobre surtos de criptosporidiose relacionados à contaminação da água de abastecimento ocorreram nos EUA, em San Antonio, no Texas, em 1984, concomitantemente a um surto de vírus Norwalk (D'ANTONIO *et al.*, 1985) e na Geórgia em 1987 (HAYES *et al.*, 1989). Porém, o maior deles foi registrado na cidade de Milwaukee (E.U.A.), em 1993, tendo como agentes etiológicos *C. parvum* e *C. hominis*. Este surto atingiu aproximadamente 403.000

pessoas residentes nesta cidade e a água disponibilizada para consumo foi considerada o foco de infecção (HAAS & ROSE, 1994). Desde então, casos de criptosporidiose têm sido registrados em mais de quarenta países tanto em indivíduos imunocompetentes como em pacientes imunodeprimidos (DILLINGHAM *et al.*, 2002). Após os primeiros surtos ocorridos nos Estados Unidos da América, a Agência Norte Americana de Proteção Ambiental – USEPA (United States Environmental Protection Agency) incluiu a pesquisa de *Cryptosporidium* na lista de prioridades para avaliação da água potável (SAVIOLI *et al.*, 2006). Em 1994, a criptosporidiose tornou-se doença de notificação compulsória no Canadá (ISSAC-RENTON *et al.*, 1999). Mais tarde, tal medida também foi adotada nos países da União Europeia (SEMENZA & NICHOLS, 2007). A criptosporidiose é considerada uma doença emergente e a Organização Mundial da Saúde (OMS) a coloca na lista de doenças negligenciadas (SAVIOLI *et al.*, 2006).

### 3.2. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

O filo Apicomplexa é formado por numerosos gêneros de parasitos eucariotos patógenos inclusive dos seres humanos (*Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Cyclospora* e *Isospora*), gado bovino (*Theileria* e *Babesia*), aves (*Eimeria*) e animais domésticos (*Sarcocystis* e *Neospora*). Uma característica peculiar dos representantes do filo Apicomplexa é a presença de um conjunto de organelas na região apical (roptrias, micronemas, conóide e microtúbulos) somente visíveis em microscopia eletrônica, responsáveis pela capacidade destes microrganismos de invadir células e se mutiplicarem no interior destas, como parasitos intracelulares (Figura 1) (BLACKMAN & BANNISTER, 2001).

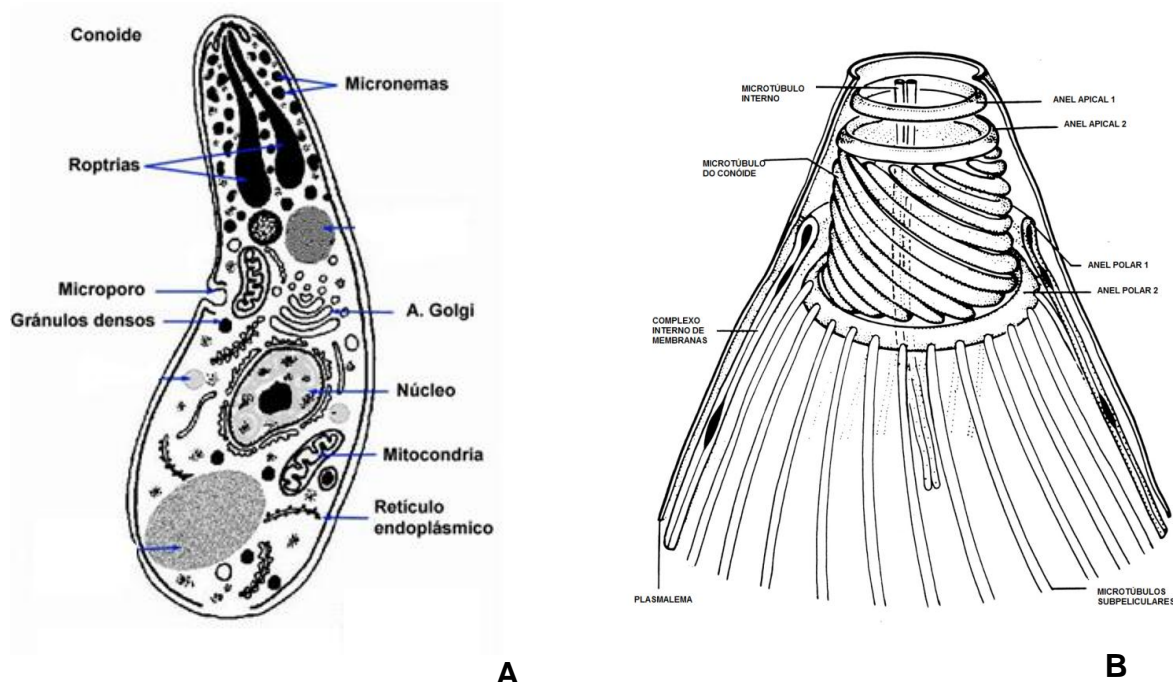


Figura 1. A - Aspecto geral de um representante do Filo Apicomplexa. B - Estrutura do complexo apical.

FONTE: <http://cmr.asm.org/content/11/2/267>

Para certos gêneros deste filo (*Caryospora* sp., *Cyclospora* sp., *Eimeria* sp., *Isospora* sp., *Sarcocystis* sp. e *Toxoplasma* sp.) características biológicas, como especificidade pelo hospedeiro, tamanho, forma e estrutura interna do oocisto, presença de esporocistos e esporozoítos são suficientes para a identificação. Porém, como os oocistos apresentam morfologia comum em várias espécies e possuem tamanho tão reduzido que sua estrutura interna não é visível, a identificação em nível específico torna-se complexa. Esta dificuldade é encontrada em todas as espécies de *Cryptosporidium* que tem ainda como agravante, os pequenos oocistos (4 a 7  $\mu\text{m}$ ) que podem ser confundidos com outras estruturas, habitualmente encontradas nas fezes ou em amostras ambientais, como leveduras e microalgas (Figura 2) (FAYER, 2004).

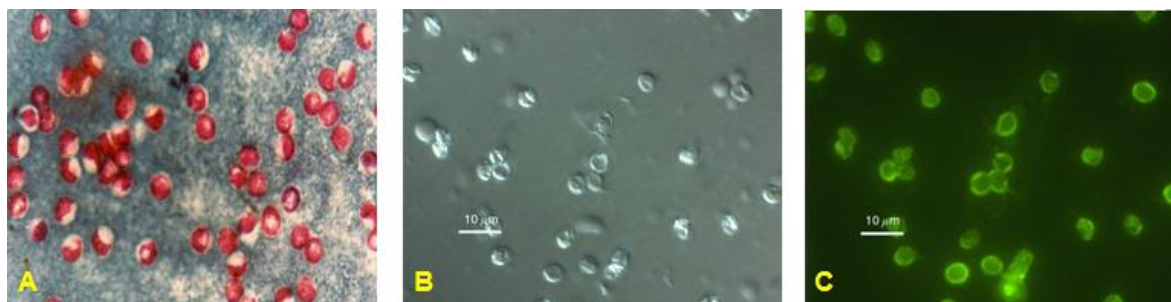


Figura 2 – Oocistos de *Cryptosporidium* 1000X. A – Coloração de Ziehl-Neelsen modificada. B – Observação microscópica em contraste de fase. C – Imunofluorescência.  
 FONTE: U.S. Environmental Protection Agency.

Segundo Levine (1980) e Levine *et al.* (1980) *Cryptosporidium* apresenta a seguinte posição sistemática:

Filo Apicomplexa Levine, 1970  
 Classe Sporozoea Leuckart, 1879  
 Subclasse Coccidia Leuckart, 1879  
 Ordem Eucoccidiida Léger & Duboscq, 1910  
 Sub-ordem Eimeriina Léger, 1911  
 Família Cryptosporidiidae Léger, 1911  
 Gênero *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907

A maioria das espécies de *Cryptosporidium* é identificada de acordo com características morfológicas dos oocistos e com a habilidade de infectar um hospedeiro específico/dominante (Quadro 1). Até o momento são válidas vinte e uma espécies e quarenta e quatro genótipos (XIAO *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2005).

A taxonomia de *Cryptosporidium* está sofrendo modificações, pois algumas espécies parecem ter pouca especificidade pelo hospedeiro (FAYER, 2004).

Os seres humanos são considerados reservatórios primários de *C. hominis* (FAYER, 2004). Outras espécies de parasitos, já registradas em humanos, especialmente, imunodeprimidos são: *C. parvum*, *C. muris*, *C. felis*, *C. canis*, *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. wairi*, *C. saurophylum*, *C. andersoni* e *C. serpentis* (HUNTER & NICHOLS, 2002). Entretanto, as taxas de transmissão entre animais silvestres e de criação para os seres humanos têm sido subestimadas (APPELBEE *et al.*, 2005). *C. parvum* é a espécie mais amplamente distribuída, afetando 155

espécies de mamíferos, sendo o gado doméstico o principal reservatório (FAYER, 2004).

Quadro 1. Espécies de *Cryptosporidium*, dimensão dos oocistos, localização primária no hospedeiro e hospedeiros dominantes.

<b>Espécies de <i>Cryptosporidium</i></b>	<b>Dimensão dos oocistos em micrômetros (comprimento x largura)</b>	<b>Localização no Hospedeiro</b>	<b>Hospedeiros Dominantes</b>
<i>C. andersoni</i>	5,0-6,5 X 6,0-8,1	Estômago	Bovinos, camelos
<i>C. baley</i>	4,2 X 6,2	Traquéia, bursa de Fabrício e cloaca	Galinhas, pavões
<i>C. bovis</i>	4,7-5,3 X 4,1-4,7	Intestino delgado	Bovinos
<i>C. canis</i>	4,9 X 4,7	Intestino delgado	Canídeos, humanos
<i>C. fayeri</i>	4,5-5,1 X 3,8-5,0	Epitélio intestinal	Canguru vermelho
<i>C. felis</i>	4,5 X 5,0	Intestino delgado	Gatos
<i>C. fragile</i>	Não estimado	Intestino	Anfíbios
<i>C. galli</i>	8,5-8,8 x 6,2-6,4	Proventrículo	Aves
<i>C. hominis</i>	4,5-5,5	Intestino delgado	Humanos e macacos
<i>C. macropodum</i>	Não estimado	Intestino	Canguru gris
<i>C. meleagridis</i>	4,0-4,5 X 4,60-5,2	Intestino delgado	Pavões
<i>C. molnari</i>	4,7 X 4,4	Estômago	Peixes
<i>C. muris</i>	5,6 X 7,4	Estômago	Roedores
<i>C. parvum</i>	4,5 X 5,5	Intestino delgado	Bovinos, ovinos, caprinos, humanos
<i>C. ryanae</i> (anteriormente descrito como <i>Cryptosporidium</i> semelhante ao genótipo bovino)	2,9-4,4 X 2,9-3,6	Intestino delgado	Bovinos
<i>C. scophthalmi</i>	3,7-5,0 X 3,0-4,6	Epitélio e lúmen intestinal	Peixes
<i>C. serpentis</i>	4,8-5,6 X 5,6-6,6	Estômago	Serpentes e lagartixas
<i>C. suis</i>	5,0 X 4,4	Intestino delgado	Suínos
<i>C. varanii</i> (anteriormente conhecido como <i>C. saurophilum</i> )	4,2-5,2 X 4,4-5,6	Intestino e mucosa cloacal	Lagartixas
<i>C. xiaoi</i>	2,9-4,4 X 2,9-4,4	Intestino delgado	Ovinos
<i>C. wrairi</i>	4,0-5,0 X 4,8-5,6	Intestino delgado	Cobaias

FONTE: Adaptado de SMITH & NICHOLS, 2005 e SMITH & NICHOLS (2010).



### 3.3. BIOLOGIA

Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* apresentam biologia bastante diferenciada. São considerados intracelulares, porém extracitoplasmáticos. Situam-se na superfície das células epiteliais, onde há a formação de uma organela multimembranosa, na união do parasito com a célula epitelial, a qual se acredita ter importância na absorção de nutrientes da célula parasitada (SPANIO & CRISANTI, 2000).

O tamanho reduzido do oocisto com esporozoítos livres (sem esporocistos) e a presença de oocistos de membrana espessa e de membrana fina, responsáveis, respectivamente, pela transmissão de um reservatório para outro e a possibilidade de autoinfecção interna (THOMPSON *et al.*, 2005), são aspectos singulares na biologia deste parasito.

O gênero *Cryptosporidium* apresenta diferenças significativas nos genes nucleares, do complexo apical e das mitocôndrias (ZHU *et al.*, 2000). Possui genoma compacto, onde várias vias biossintéticas apresentam-se simplificadas ou desapareceram (ABRAHAMSEN *et al.*, 2004).

Um grande progresso nos estudos relacionados a este gênero tem ocorrido com o advento das técnicas moleculares, por exemplo, o sequenciamento dos genomas de *C. parvum* tipo II e de *C. hominis* (XU *et al.*, 2004; ABRAHAMSEN *et al.*, 2004). A maioria dos trabalhos sobre *Cryptosporidium* são particularmente da última década, merecendo destaque os estudos moleculares (XIAO, 2010).

Estudos filogenéticos e da sequência do genoma de *C. parvum*, colocam em dúvida diversos aspectos da biologia deste parasito. Até o momento, *Cryptosporidium* é considerado um parasito intracelular obrigatório, porém estudos realizados *in vitro* demonstraram sua habilidade em realizar seu ciclo de vida sem a necessidade de células (HIJJAWI *et al.*, 2004). Notáveis semelhanças entre o ciclo de vida de *Cryptosporidium* e de algumas espécies de gregarinas como *Mattesia dispora*, *M. geminata* e *Gregarina tribolorum* tem sido observadas. Os esporozoítos, uma vez que saem do oocisto, se transformam em trofozoítos que se agrupam formando os merontes de tipo I e II, destes últimos formam-se os merozoítos que darão origem aos estádios sexuais. Os gametócitos extracelulares de *Cryptosporidium* em cultivo são similares às estruturas originadas pela fusão dos

esporozoítos em algumas gregarinas. *Cryptosporidium* juntamente com estes protozoários apresenta movimentos de deslizamento (Figura 3) (THOMPSON *et al.*, 2005; PUTIGNANI & MENCHELLA, 2010).



Figura 3. Ciclo biológico de *Cryptosporidium* nos enterócitos.  
FONTE: Adaptado de PUTIGNANI & MENCHELLA (2010).

O ciclo biológico de *Cryptosporidium* é monoxeno, a principal forma de infecção ocorre pela ingestão da água de beber, seguida por água de recreação e alimentos. Após a ingestão os oocistos desencistam e os esporozoítos são liberados no intestino delgado e parasitam as células epiteliais do trato gastrointestinal. Nestas células os parasitos realizam reprodução assexuada (esquizogonia ou merogonia) e em seguida a reprodução sexuada (gametogonia), produzindo macrogametas e microgametas. Após a fecundação dos macrogametas pelos microgametas, os oocistos se desenvolvem e esporulam no hospedeiro infectado. Dois diferentes tipos de oocistos são produzidos: oocistos de parede espessa, que comumente são eliminados nas fezes do hospedeiro e oocistos de parede fina que estão envolvidos com a autoinfecção do hospedeiro (PUTIGNANI & MENCHELLA, 2010).

Considerando que hospedeiros próximos geneticamente albergam com frequência parasitos relacionados, a teoria da coevolução entre parasito-hospedeiro

tem sido proposta para *Cryptosporidium*. No entanto, animais que atualmente são considerados reservatórios do parasito não necessariamente são aqueles em que a espécie evoluiu (THOMPSON *et al.*, 2005). Como exemplo, pode ser citado o caso de *C. meleagridis* que segundo alguns autores primariamente parasitava mamíferos e passou a parasitar aves (HIJJAWI *et al.*, 2004).

Trabalhos que visem padronizar o cultivo *in vitro* de *Cryptosporidium* são importantes para várias linhas de pesquisa, sendo considerada a melhor forma para verificar a viabilidade de oocistos encontrados em amostras de água. Ainda, podem fornecer detalhes sobre o ciclo de vida, avaliar afinidades de *Cryptosporidium* com outros Apicomplexa, testar medicamentos e para estudos de desinfecção (HIJJAWI, *et al.*, 2010).

O desenvolvimento completo de *C. parvum* e *C. baileyi* foi realizado em embriões de galinha (CURRENT & LONG, 1983). A espécie *C. parvum*, isolada de humanos e bovinos, teve seu ciclo de vida realizado em células da membrana do corialantóide de embriões de galinha. Este modelo entrou em desuso por produzir poucos oocistos e pela dificuldade em separar os estágios de desenvolvimento de *Cryptosporidium* dos tecidos do hospedeiro (CURRENT & GARCIA, 1991).

O desenvolvimento completo de *Cryptosporidium* tem sido observado em várias linhagens de células com a produção de alguns oocistos (CURRENT & LONG, 1983; BURAUD *et al.*, 1991; RASMUSSEN *et al.*, 1993; EGGLESTON *et al.*, 1994; YANG *et al.*, 1996; HIJJAWI *et al.*, 2001; HIJJAWI, *et al.*, 2002; LACHARME *et al.*, 2004). Esta forma de cultivo (celular) para *Cryptosporidium* possui limitações, devido à morte rápida e crescimento excessivo das células infectadas da monocamada de células infectadas, onde ocorre reduzida proliferação dos estágios do ciclo de vida deste parasito (HIJJAWI *et al.*, 2001).

O ciclo de vida completo de *Cryptosporidium* (de esporozoítos a oocistos esporulados) em meios de cultura livres de células, foi registrado pela primeira vez por Hijjawi *et al.* (2004) em meio RPMI 1640.

### 3.4. ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENIA

Na última década a utilização de técnicas moleculares permitiu a identificação das espécies de *Cryptosporidium*, fornecendo dados mais precisos que foram aplicados em estudos de sistemática e ecologia, como, por exemplo, taxonomia, evolução biológica, genética de populações, estrutura de comunidades, epidemiologia e interação com seus hospedeiros. A caracterização molecular possibilita a detecção de variações genéticas em *Cryptosporidium*, fato que tem causado grande impacto na elucidação da sua taxonomia e na epidemiologia da criptosporidiose (XIAO *et al.*, 2000; APPELBEE *et al.*, 2005).

Técnicas como a amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD) foram bastante utilizadas para caracterizar cepas em estudos epidemiológicos (MORGAN *et al.*, 1995; MORGAN *et al.*, 1996; MORGAN *et al.*, 1999a; MORGAN *et al.*, 1999). Nesta técnica não é necessário conhecer a sequência de DNA, pois ocorrem amplificações randômicas do genoma. Os fragmentos de DNA são separados por eletroforese e o padrão de bandas resultantes é usado como perfil genômico (*fingerprint*) para comparação das cepas (MONIS & ANDREWS, 1998). Atualmente, esse tipo de análise está em desuso devido a maior robustez da técnica do sequenciamento, o qual vem sendo amplamente utilizado em trabalhos de filogenia molecular trazendo elucidação e também muitos questionamentos sobre a posição sistemática de *Cryptosporidium* (GATEI *et al.*, 2003; NG *et al.*, 2006).

De acordo com a filogenia molecular (ADL, 2007) os eucariotos são divididos em seis grupos: 1. Opisthokonta, onde são agrupados animais, fungos, coanoflagelados e Mesomycetozoa; 2. Amoebozoa, que agrupa amebas, tecamebas, amebas flageladas e várias espécies sem mitocôndrias. 3. Excavata, neste grupo estão os oxymonados, parabasalís, diplomonados, jakobidos e muitos outros gêneros de flagelados heterotróficos, incluindo os Euglenozoa e Heterolobosea. 4. Rhizaria, o qual inclui os foraminíferos, a maioria dos radiolários e os Cercozoa que possuem filopódios e também algumas tecamebas e amebas flageladas. 5. Archaeplastida, neste grupo estão os Glaucophyta, algas vermelhas, verdes e plantas. 6. Chromoalveolata, neste grupo, estão os alveolados (ciliados, dinoflagelados, Apicomplexa), Stramenopiles (algas pardas, diatomáceas, alguns fungos zoósporos e opalinas, entre outros).

O clado Chromoalveolata é derivado da simbiose de um ser heterotrófico fagotrófico com uma alga vermelha fotossintetizante eucariota. Os plastídeos foram secundariamente perdidos em muitas linhagens. No entanto, há ainda muitas incertezas com relação à subdivisão destes seis grandes clados, destes dois merecem especial atenção os Chromoalveolata e os Excavata (SIMPSON & ROGER, 2002). Neste tipo de classificação não são adotadas categorias hierárquicas, com o intuito de evitar que um pequeno grupo de organismos ou mesmo um único organismo, tragam uma cascata de modificações no sistema de classificação, fato que torna esta forma de abordagem mais flexível e fácil de sofrer modificações. Nesta classificação, o parasito *Cryptosporidium* é agrupado com os gêneros *Cyclospora*, *Eimeria* e *Hepatozoon* (ADL *et al.*, 2007).

De acordo com o projeto “Tree of Life” (<http://tolweb.org/tree/>), o qual resulta da soma de esforços de pesquisadores que contribuem com informações sobre história evolutiva (filogenia), os Apicomplexa, Dinoflagelados e Ciliados são classificados como Alveolata, juntamente com o recém-descoberto *Chromera velia*, um organismo que compartilha muitas semelhanças com o grupo Apicomplexa (LEE *et al.*, 2000, MOORE *et al.*, 2008).

Análises da subunidade menor do rRNA (RNA ribossômico) confirmaram que o grupo Apicomplexa está mais estreitamente relacionado com os dinoflagelados, os quais apresentam flagelos (VAN PEER & DE WACHTER, 1997; FAST *et al.*, 2002).

Mais recentemente, investigações de genes plastidiais indicaram uma relação mais íntima com o filo Chromerida (MOORE *et al.*, 2008). Além disso, 18 genes plastidiais foram encontrados em comum entre a linhagem dos alveolados e das algas vermelhas, confirmando a ancestralidade entre estas algas e os Apicomplexa (JANOUSKOVEC *et al.*, 2010).

*Cryptosporidium* é tradicionalmente considerado membro dos coccídios, no entanto, evidências filogenéticas mostram grande afinidade com gregarinas (ZHU *et al.*, 2000; LEANDER, 2007a). Alguns achados moleculares sugerem uma relação ancestral de *Cryptosporidium* e bactérias do gênero *Helicobacter* (FAYER, 2004). Estes dados indicam que *Cryptosporidium* durante sua evolução divergiu tanto dos coccídios, como de quase todos os membros do filo Apicomplexa (TENTER *et al.*, 2002). O sequenciamento do genoma parcial/total de algumas espécies de

*Cryptosporidium*, não ajudou a resolver esse problema, mas demonstrou que *Cryptosporidium* tem posição única, não podendo ser incluído no mesmo grupo de: *Plasmodium*, *Theileria*, *Babesia*, *Eimeria*, *Toxoplasma* e *Neospora* (Figura 4). Há necessidade de mais dados comparativos de gregarinas, grupo a partir do qual *Cryptosporidium* pode ter evoluído. Portanto, *Cryptosporidium* não deve ser classificado como um coccídio. Sua posição exata dentro do grupo Apicomplexa ainda está incerta (RUECKERT *et al.*, 2011; SLAPETA, 2013). Para caracterizar a diversidade dentro das espécies *C. parvum* e *C. hominis*, a técnica mais comumente utilizada é a análise por microssatélites. Os *loci* hipervariáveis também são úteis como ferramentas de *fingerprint*, para fornecer marcadores para identificação de cepas. Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*), de dois a quatro nucleotídeos de tamanho, estão dispersos no genoma da maioria dos organismos e presentes em todos os organismos eucariotos (CACCIÒ *et al.* 2000; CACCIÒ *et al.*, 2001; LEONI *et al.*, 2007; MATTSSON *et al.*, 2007).

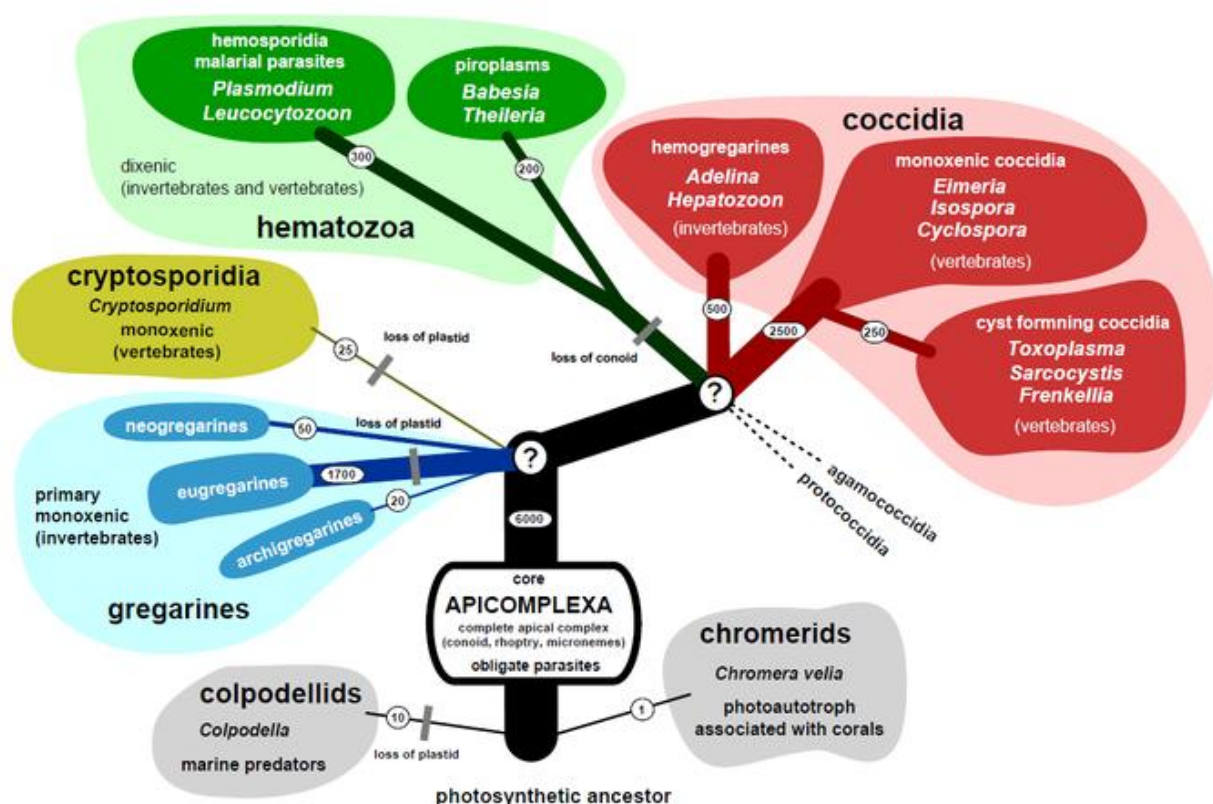


Figura 4. Árvore filogenética hipotética do grupo Apicomplexa. Os três principais grupos parasitos estão em cores e seu ciclo de vida indicado, bem como *Cryptosporidium* o qual emerge das gregarinas. O número de ramos e sua espessura indicam diversidade (número de espécies).  
 FONTE: SLAPETA (2011). <http://tolweb.org/apicomplexa/2446>

### 3.5. PATOGENIA, SINTOMATOLOGIA E TRATAMENTO

O modo como *Cryptosporidium* causa diarreia ainda não é conhecido (BIRD, 1980). Vários mecanismos são sugeridos, como: rompimento de microvilosidades levando a diminuição da área de superfície e redução da absorção intestinal e digestão, a presença de enterotoxina produzida pelo parasito ou pelo hospedeiro e fatores de adesão afetando a fixação do parasito nas células hospedeiras (ARGENZIO *et al.*, 1993; FAYER *et al.*, 1997).

A criptosporidiose é entendida como uma infecção entérica humana de considerável incidência tanto em países desenvolvidos, como naqueles em desenvolvimento, pois pode causar a diarreia, trazendo problemas de absorção e secreção intestinal (FARTHING, 2000).

*Cryptosporidium* é considerado a principal causa de diarreia dentre as enfermidades parasitárias registradas em crianças de países em desenvolvimento, particularmente antes dos dois anos de idade. Aproximadamente 12% dos casos de diarreia, nestes países, podem ser causados por este parasito (CHEN *et al.*, 2002). Um estudo sugere possível predisposição genética à criptosporidiose em crianças de Bangladesh, portadoras dos alelos B\*15 HLA e DQB1\*0301HLAII (KIRKPATRICK *et al.*, 2008).

O gênero *Cryptosporidium* está classificado em segundo lugar entre os patógenos causadores de diarreia severa e morte de crianças menores de dois anos de idade, perdendo apenas para o rotavírus (Figura 5) (STRIEPEN, 2013).

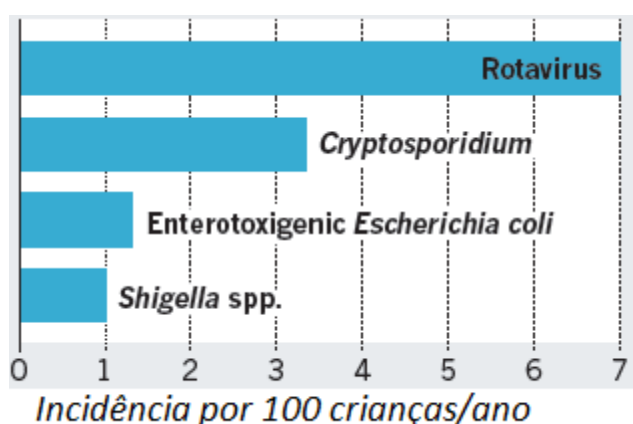


Figura 5. Incidência de agentes causadores de diarreia severa em crianças no mundo.

FONTE: STRIEPEN (2013).

A criptosporidiose apresenta como sintomatologia diarreia aguda que pode ser acompanhada de dor abdominal. Podem ocorrer náuseas, vômitos, inapetência, perda de peso, febre, problemas respiratórios e a perda intensa de líquidos provoca desidratação severa (TZIPORI & WARD, 2002; FAHEY, 2003; FAYER, 2004). As fezes podem apresentar muco, porém a presença de sangue e leucócitos é rara, por se tratar de uma diarreia não inflamatória (FAHEY, 2003). A duração e intensidade dos sintomas clínicos são variáveis (FAYER, 2004) dependendo da idade e do estado imunológico da pessoa infectada (CHEN *et al.*, 2002) mas também da virulência da cepa do parasito (FAHEY, 2003). Em pessoas imunocompetentes a criptosporidiose é assintomática ou auto-limitada podendo persistir de sete a dez dias, até algumas semanas (CHEN *et al.*, 2002). Já em indivíduos imunodeprimidos, por causas diversas, pode evoluir para uma forma crônica durando meses ou anos. Em pacientes com SIDA a criptosporidiose é potencialmente grave, podendo o parasito ser encontrado fora do intestino, como por exemplo: pulmões, fígado, pâncreas e estômago (FARTHING, 2000), e nestes casos a mortalidade pode chegar a 50 %.

Em humanos voluntários infectados experimentalmente, por *Cryptosporidium parvum* foram detectados anticorpos da mucosa intestinal (IgA - imunoglobulina A) fecal anti-*Cryptosporidium* (DANN *et al.*, 2000). Alguns autores sugerem que indivíduos com anticorpos pré-existent para *Cryptosporidium* podem ser parcialmente protegidos e apresentar sintomas mais discretos (MOSS *et al.*, 1998; CHAPPELL *et al.*, 1999; FROST *et al.*, 2005).

Em animais domésticos, a infecção geralmente ocorre entre a primeira e quarta semanas de vida. A duração da sintomatologia é de aproximadamente duas semanas e os sinais clínicos predominantes tanto nos animais de estimação, quanto nos animais de produção é uma diarreia profusa, que pode levar à morte por desidratação (OLSON *et al.*, 2011).

A gravidade da criptosporidiose varia dependendo do grau de imunodepressão dos indivíduos. Em pacientes com contagem de células CD4+ acima de 180 células/mm<sup>3</sup>, a infecção pode ser assintomática ou ocorrer diarreia branda. Entretanto, em pacientes com contagem de células CD4+ abaixo de 50 células/mm<sup>3</sup> pode ocorrer o desenvolvimento de diarreia persistente (HUANG & WHITE, 2006).



Desde a descoberta da criptosporidiose, pouco progresso tem ocorrido no desenvolvimento de tratamentos eficazes (TZIPORI & WIDMER, 2008).

O tratamento para a criptosporidiose não pode ser considerado eficiente e confiável e a localização deste parasito nas células é, provavelmente, a grande responsável pela resistência às drogas utilizadas até o momento. Em indivíduos imunocompetentes o tratamento é baseado na rehidratação e reposição de sais. Em indivíduos imunodeprimidos utiliza-se terapia antiretroviral, visando um aumento na produção de linfócitos CD4 e levando a uma melhora clínica e redução da eliminação de oocistos nas fezes. Em alguns casos podem ser ministradas drogas antiparasitárias como paramomicina, azitromicina e nitazoxanida (ABUBAKAR *et al.*, 2007; HONG *et al.*, 2007).

De acordo com MEAD (2014) o entendimento das relações parasito-hospedeiro e dos elementos essenciais das respostas imunes nas infecções por *Cryptosporidium* levará ao desenvolvimento de efetivas imunoterapias ou vacinas. O aumento de informações referentes ao genoma do parasito poderá ajudar a caracterizar antígenos e potenciais candidatos à vacina.

### 3.6. DIAGNÓSTICO PARA *Cryptosporidium*

O diagnóstico confirmatório da criptosporidiose é feito por meio de técnicas laboratoriais, que permitem a observação de oocistos presentes nas fezes de humanos e animais. As técnicas de rotina são baseadas em métodos de concentração dos oocistos do parasito e têm como princípio a flutuação ou a centrífugo-sedimentação. As técnicas de concentração de oocistos mais comuns são: flutuação em solução saturada de açúcar, solução de sulfato de zinco ou de cloreto de sódio saturado e sedimentação por meio de éter-formalina e acetato-formalina (CURRENT & GARCIA, 1991; KAR *et al.*, 2011).

O método de coloração ácido resistente continua sendo o mais utilizado para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* (FAHEY, 2003), devido ao baixo custo, fácil execução e utilização de microscópio óptico comum. Duas técnicas de coloração são utilizadas: Kinyoun e Ziehl-Neelsen (XIAO & CAMA, 2006). Os fatores limitantes destas duas técnicas são o tamanho reduzido dos oocistos (4-8 µm), que podem ser confundidos com partículas orgânicas coradas, podendo levar a

resultados falso-positivos o que demonstra a importância de um técnico de laboratório treinado (FAHEY, 2003).

Métodos imunológicos também podem ser utilizados para o diagnóstico da criptosporidiose e apresentar vantagens sobre a microscopia óptica baseada em colorações tradicionais. A técnica de imunofluorescência direta (IFD) utiliza anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína que reconhecem epítomos específicos presentes na superfície dos oocistos. Apresenta alta especificidade (96 a 100%) e alta sensibilidade (98,5 a 100%) na detecção de oocistos de *Cryptosporidium* presentes nas fezes ou em amostras ambientais) água, solo) (JEX *et al.*, 2008).

Técnicas sorológicas são menos utilizadas. Anticorpos específicos são detectados por imunofluorescência indireta (IFI), no soro de pessoas que tiveram a infecção. Imunoglobulinas M e G (IgM e IgG) anti-*Cryptosporidium* específicas podem ser detectadas pelo método imunoenzimático (ELISA) (CURRENT & GARCIA, 1991; SMITH & NICHOLS, 2010). Este método pode ter grande importância em estudos epidemiológicos (FAHEY, 2003).

Devido ao fato de *Cryptosporidium* infectar vários animais e, os seus oocistos estarem presentes no ambiente, os seres humanos podem infectar-se de várias maneiras, tais como: contato direto (pessoa-pessoa), por meio de animais (transmissão zoonótica) e ainda pela ingestão de alimentos e água contaminados com o parasito. A importância de cada um destes modos de transmissão da criptosporidiose ainda não está completamente estabelecida e as técnicas tradicionais de microscopia utilizadas para o seu diagnóstico não permitem determinar com precisão a origem da contaminação (XIAO, 2010).

Métodos moleculares para detecção do DNA do parasito apresentam sensibilidade e especificidade maiores que as da observação microscópica e podem ser empregados tanto no diagnóstico das infecções quanto no monitoramento da contaminação ambiental. Sondas de DNA (espécie-específica ou gênero-específica) foram utilizadas para detectar *Cryptosporidium* em tecidos do trato gastrointestinal de serpentes (RICHTER *et al.*, 2008a; RICHTER *et al.*, 2008b), em amostras de água (TAGUCHI *et al.*, 2006) e para determinar a viabilidade de oocistos presentes em fezes (LE MOS *et al.*, 2005).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido muito utilizada, bem como suas variações. Uma das variações, PCR-multiplex, utiliza dois ou mais pares de iniciadores, para identificação de espécies ou gêneros de organismos presentes em uma mesma amostra e em uma única reação de PCR. A Nested-PCR (N-PCR) é um método sensível de PCR no qual o produto amplificado (*amplicon*) é submetido a um segundo processo de amplificação utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a sequências internas do segmento amplificado. Este procedimento torna a reação da PCR mais específica e sensível. Outra variação da PCR tradicional é a PCR em tempo real, em que os resultados podem ser observados enquanto a reação ocorre desta forma, a amplificação e a quantificação da amplificação são mensuradas simultaneamente. Estas técnicas podem ser utilizadas para a quantificação de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras clínicas ou ambientais (HAQUE *et al.*, 2007; PARR *et al.*, 2007; TEM-HOVE *et al.*, 2007; MINAROVICOVÁ *et al.*, 2009; BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET *et al.*, 2009; GARCÉS-SANCHEZ *et al.*, 2009).

A PCR-RFLP é um método utilizado para detectar mínimas variações num gene em que uma única substituição de base pode criar um sítio que será digerido pela enzima de restrição endonuclease. Na PCR-RFLP, a PCR é usada para amplificar a região do gene de interesse e os produtos da amplificação (*amplicons*) são digeridos por enzimas e analisados em gel de agarose ou de poliacrilamida por eletroforese. Esta técnica vem sendo utilizada para a detecção e diferenciação de espécies e/ou genótipos de *Cryptosporidium* (XIAO *et al.*, 1999; GUYOT *et al.*, 2002; LEONI *et al.*, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008; PIRESTANI *et al.*, 2008; QUÍLEZ *et al.*, 2008a; LUPO *et al.*, 2008; ZAVVAR *et al.*, 2008; WALDRON *et al.*, 2009; ZINTL *et al.*, 2009).

Uma revisão dos trabalhos mais recentes sobre genotipagem de *Cryptosporidium* revelou a utilização de ferramentas moleculares baseadas no rRNA (SSU) em 100 dos 116 artigos encontrados. A subunidade do rRNA (SSU) vem sendo usada para a identificação de genótipos de *Cryptosporidium* encontrado em humanos, animais e em amostras de água. Em particular, a técnica de PCR-RFLP que marca um fragmento de DNA de aproximadamente 830 pb (pares de bases) é comumente empregada (XIAO, 2010).

O uso rotineiro do gene rRNA (SSR) na genotipagem de *Cryptosporidium* deve-se ao imenso número de cópias naturalmente encontradas deste gene e da presença de regiões semi-conservadas e hipervariáveis, que facilitam o desenvolvimento de iniciadores gênero-específicos. Ferramentas moleculares baseadas em outros genes foram desenvolvidas, porém, tiveram considerável redução de sua utilização nos últimos anos (XIAO *et al.*, 2000). Como exemplo, pode ser citada a técnica baseada no gene da proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* (COWP), que apresentou baixa especificidade na genotipagem das espécies de *Cryptosporidium* (GIANGASPERO *et al.*, 2006; PAZIEWSKA *et al.*, 2007; TRAVERSA *et al.*, 2008). Técnicas moleculares para a identificação de subtipos de *Cryptosporidium* são usadas em estudos de transmissão de *C. hominis* em humanos e *C. parvum* em humanos e ruminantes. Uma das técnicas mais populares é a análise da sequência do DNA da glicoproteína 60 kDa (gp60, também denominada gp4015) devido ao fato de apresentar sequências semelhantes a de microssatélites, com repetições do código do trinucleotídeo da serina (SULAIMAN *et al.*, 2005).

O recente sequenciamento dos genomas de *C. parvum* e *C. hominis* permitiu a identificação de sequências de microssatélites e minissatélites nestas espécies, além da identificação de alto polimorfismo entre elas, as quais são utilizadas em análises de multilocus para aumentar a acurácia da subtipagem. Duas técnicas são utilizadas na subtipagem. Uma de tipagem em multilocus (MLT), em que variações em microssatélites e minissatélites são aferidas com base nas variações do comprimento dos fragmentos de DNA, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida ou tecnologia de GeneScan (MORRISON *et al.*, 2008) e outra técnica, denominada sequência de tipagem de multilocus (MLST), que se fundamenta na detecção de heterogeneidade genética por sequenciamento do DNA amplificado pela PCR (CAMA *et al.*, 2006b). Estas técnicas são utilizadas em estudos de genética de populações e distribuição geográfica de *C. hominis* e *C. parvum* (MORRISON *et al.*, 2008).

Muitos são os avanços realizados e técnicas desenvolvidas para a identificação de *Cryptosporidium*, porém, estas são utilizadas em escala experimental, nos laboratórios de pesquisa. Seus insumos são caros e requerem longo período de padronização para a obtenção de resultados satisfatórios. Neste

sentido, o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e baratas, poderia auxiliar na realização de diagnósticos em larga escala, nos laboratórios de diagnósticos clínicos e de empresas de tratamento de água. Diante disso, pode ser citada a técnica LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) a qual pode ser considerada uma grande promessa em diagnóstico rápido para a criptosporidiose e outras doenças parasitárias. Esta técnica é mais rápida, nela são utilizados 6 iniciadores e não há necessidade de um termociclador. Os resultados podem ser observados em aproximadamente uma hora, sem precisar da confecção de géis para observação da positividade da reação, aqueles podem ser observados por meio do turvamento do meio ou pela mudança de cor utilizando-se o fluorógeno SYBR green I (PARIDA *et al.*, 2008).

Nos últimos anos a imunocromatografia em kits de teste rápido, para detecção qualitativa de *Cryptosporidium* em amostras de fezes, tem sido utilizada em larga escala nos países desenvolvidos, inclusive, alguns destes testes são simultâneos para a detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia*. Algumas marcas estão disponíveis no mercado (RIDA® QUICK *Cryptosporidium/Giardia* Combi), porém nos países em desenvolvimento este tipo de diagnóstico ainda não foi popularizado.

### 3.7. EPIDEMIOLOGIA E PREVENÇÃO

Os oocistos de *Cryptosporidium* apresentam diâmetro de 4 a 8 µm e podem permanecer viáveis por longo período no ambiente (CAREY *et al.*, 2004). O fato de ser eliminado do hospedeiro já infectante, o baixo número de oocistos necessários para infectar os organismos e ainda, o seu considerável potencial zoonótico contribuem para que *Cryptosporidium* seja considerado um protozoário de interesse em saúde pública (DILLINGHAM *et al.*, 2002).

A transmissão do parasito de forma indireta ocorre pela ingestão de água potável contaminada com oocistos, sendo esta, a via mais comum de infecção. Muitos surtos ocorrem na América do Norte associados a parques aquáticos e piscinas públicas (SMITH & NICHOLS, 2010). A transmissão direta entre os indivíduos ocorre devido à falta de higiene e o contato sexual oroanal (FAYER *et al.*, 2000).

Historicamente, surtos de criptosporidiose estão associados à ingestão de água de consumo e de recreação contaminadas com o parasito. No mundo, dos 325 surtos registrados associados ao consumo de água contaminada com protozoários causadores de doenças, Karanis *et al.* (2007) observaram que *Cryptosporidium* foi responsável por 50,8 % (165) deles.

A maior demanda por alimentos no mundo, associada à globalização e rapidez na entrega, aumenta a possibilidade de contaminação de alimentos com oocistos de *Cryptosporidium*. Aproximadamente, 10% dos casos de criptosporidiose nos EUA são decorrentes da ingestão de alimentos contaminados. A contaminação de frutas, vegetais e frutos do mar com oocistos de *Cryptosporidium* merece destaque uma vez que estes alimentos são consumidos crus (SMITH *et al.*, 2006). É importante ressaltar que alguns alimentos, como os frutos do mar, têm a característica de acumular contaminantes presentes na água, portanto, a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* nestes alimentos constitui uma questão de Saúde Pública (TAMBURRINI & POZIO, 1999; DOWNEY & GRACZYK, 2007).

A prevalência da criptosporidiose é mais baixa em países desenvolvidos, nos quais a população tem acesso aos serviços de saneamento ambiental de melhor qualidade, bem como a água de beber (FAYER, 2004). De acordo com dados do Banco Mundial, 4 bilhões de pessoas no mundo vivem sem rede de esgoto e 2,4 bilhões vivem sem qualquer forma de saneamento básico e diante desta realidade, a diarreia é responsável por 4% das mortes no mundo (WHO, 2008). Apesar do progresso no sentido da melhoria das condições sanitárias ambientais, o acesso ao saneamento básico e água potável para bilhões de pessoas, tem sido desigual, devido a diferenças geográficas, socioculturais e econômicas. Há uma evolução pequena destas melhorias em saneamento entre os grupos marginalizados e vulneráveis. Em 2014 a WHO criou uma agenda de desenvolvimento pós-2015 com desafios associados a esses esforços, a fim de reduzir a mortalidade associada ao consumo de água de baixa qualidade (WHO/UNICEF, 2014). *Cryptosporidium* apresenta capacidade de infectar todos os grupos de animais vertebrados. A espécie *C. parvum* é considerada aquela que possui maior potencial zoonótico e grande responsável por quadros de diarreia grave em animais de criação recém-nascidos, com consequentes perdas econômicas. *C. parvum* também tem importante papel como a espécie que mais contribui para a contaminação ambiental

(SMITH *et al.*,1995). Fatores estressantes presentes no ambiente reduzem a sobrevivência dos oocistos de *Cryptosporidium*, como, por exemplo: dessecação, temperatura e pH extremos, luz ultravioleta e exposição a fluidos biológicos (amônia presente na urina). Estes fatores estão sendo testados principalmente para o tratamento de água de consumo. Pereira *et al.* (2008) avaliaram a eficácia de inativação de oocistos de *C. parvum*, pelos seguintes compostos químicos: ácido hipocloroso, dióxido de cloro e ozônio. O ozônio foi o único composto químico que inativou 100 % dos oocistos, neste mesmo artigo, os autores sugerem a utilização de ozônio para os processos de desinfecção da água de abastecimento no Brasil.

Existem poucos registros de surtos de criptosporidiose associados ao consumo de alimentos, provavelmente devido à falta de investigação e de ferramentas adequadas. São identificadas duas formas básicas de contaminação dos alimentos associadas a surtos: fatores associados aos humanos (manipuladores de alimentos) e fatores não associados aos humanos (consumo de vegetais crus e bebidas geladas feitas com água contaminada) (SMITH & NICHOLS, 2010). Até o ano de 2010 houve registro de nove surtos de criptosporidiose no mundo associados a alimentos contaminados (Quadro 2).

Quadro 2. Surtos de criptosporidiose registrados associados aos alimentos.

<b>Número de pessoas afetadas</b>	<b>Alimento contaminado</b>	<b>Provável fonte de infecção</b>	<b>Espécie de <i>Cryptosporidium</i></b>
160	Maçã desidratada	Maças caídas contaminadas com fezes de bezerros	NA*
25	Maçã desidratada	Água utilizada para lavar as maçãs	NA
15	Salpicão	Manipulador de alimentos	NA
48 crianças de escola	Leite de vaca oferecido na escola	Falha no processo de pasteurização	NA
54	Não identificado	-	<i>C. hominis</i>
152	Cafeteria de Campus Universitário	Manipulador de alimentos	<i>C. hominis</i>
8 crianças	Leite de vaca	Falhas no processo de pasteurização	NA
12	Maças	Água utilizada para lavar as maçãs	<i>C. parvum</i>
15	Molho servido em restaurante de hotel	Salsa picada fresca adicionada após o cozimento	NA

FONTE: Adaptado de SMITH & NICHOLS (2010). \*NA = não avaliada

A criptosporidiose é adquirida por meio da ingestão de oocistos, portanto deve-se investir em medidas sanitárias preventivas para a redução da transmissão de *Cryptosporidium*. A remoção deste parasito da água continua sendo um grande desafio, inclusive para os países com avançadas tecnologias. Os processos de desinfecção da água de beber utilizados atualmente, na maioria dos países, não são capazes de inviabilizar os oocistos de *Cryptosporidium* (Figura 6) (PUTIGNANI & MENCHELLA, 2010).

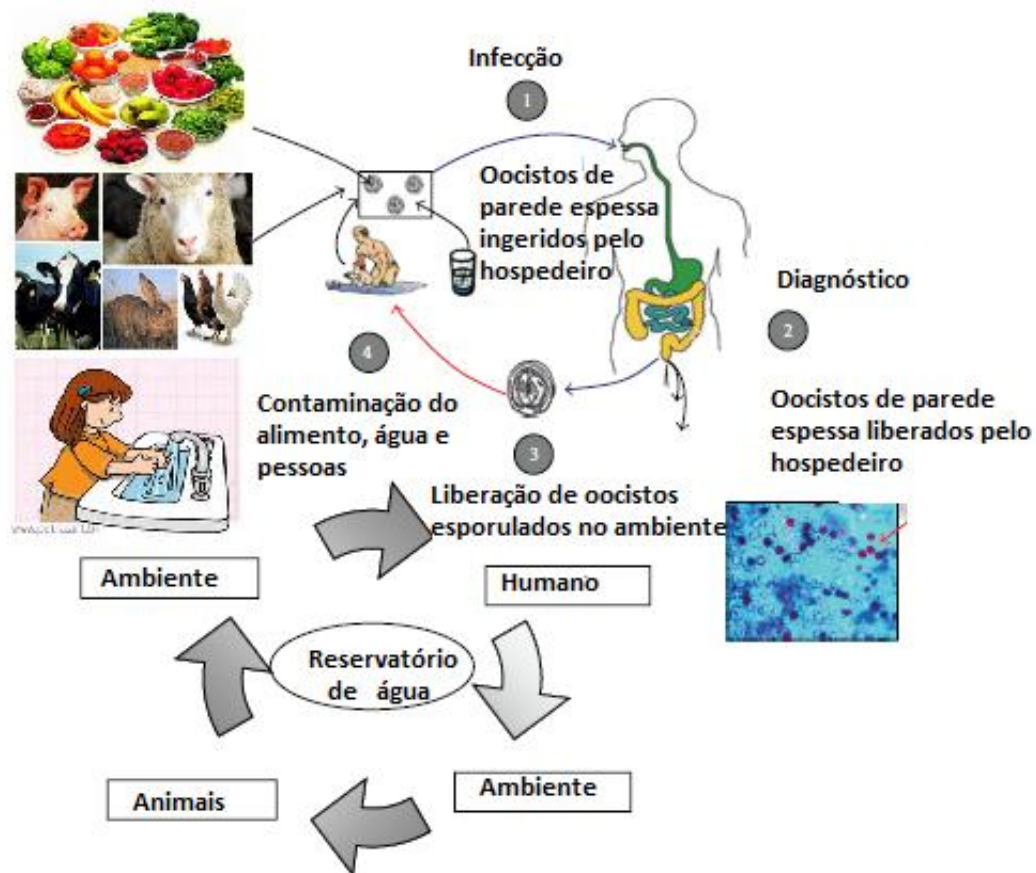


Figura 6. Descrição dos modos de transmissão de *Cryptosporidium*. Após a ingestão (ou inalação) por um hospedeiro suscetível, ocorre o desencistamento (1). Os esporozoítos liberados invadem as células epiteliais do trato gastrointestinal ou outros tecidos, completando o ciclo produzindo oocistos que saem do hospedeiro (2) e são liberados no ambiente (3). A transmissão de *Cryptosporidium* ocorre principalmente por ingestão de água contaminada, alimentos e contato pessoa-a-pessoa (4). A transmissão zoonótica de *Cryptosporidium parvum* ocorre por meio da exposição a animais infectados ou contato com água contaminada por fezes desses animais.

FONTE: Adaptado de PUTIGNANI & MENCHELLA (2010).

Para controle das infecções por *Cryptosporidium* pela ingestão de alimentos, medidas como o aquecimento (69 °C) destes são interessantes (HARP *et al.*, 1996). Com relação aos animais de criação, principalmente em grande escala, há necessidade de criar formas efetivas de tratamento dos seus dejetos.



Os seres humanos, principalmente os imunodeprimidos, devem ter boas práticas de higiene, evitar banhar-se em águas de piscinas públicas, consumir água de boa qualidade e evitar contato com animais jovens. Em hospitais, laboratórios comerciais e de pesquisas deve haver cuidado extremo com os resíduos resultantes das atividades neles desenvolvidas.

Lal *et al.* (2013) enfatizaram a significativa influência das mudanças climáticas e dos padrões de uso do solo sobre a incidência da criptosporidiose e da giardíase. Estes autores ressaltam que o aumento da temperatura e a variabilidade dos padrões de precipitação, juntamente com a intensificação do uso de terras agrícolas, em especial para a criação de gado, associados a fatores sociais e demográficos, aumentam a exposição de seres humanos e animais a estes patógenos (Figura 7).

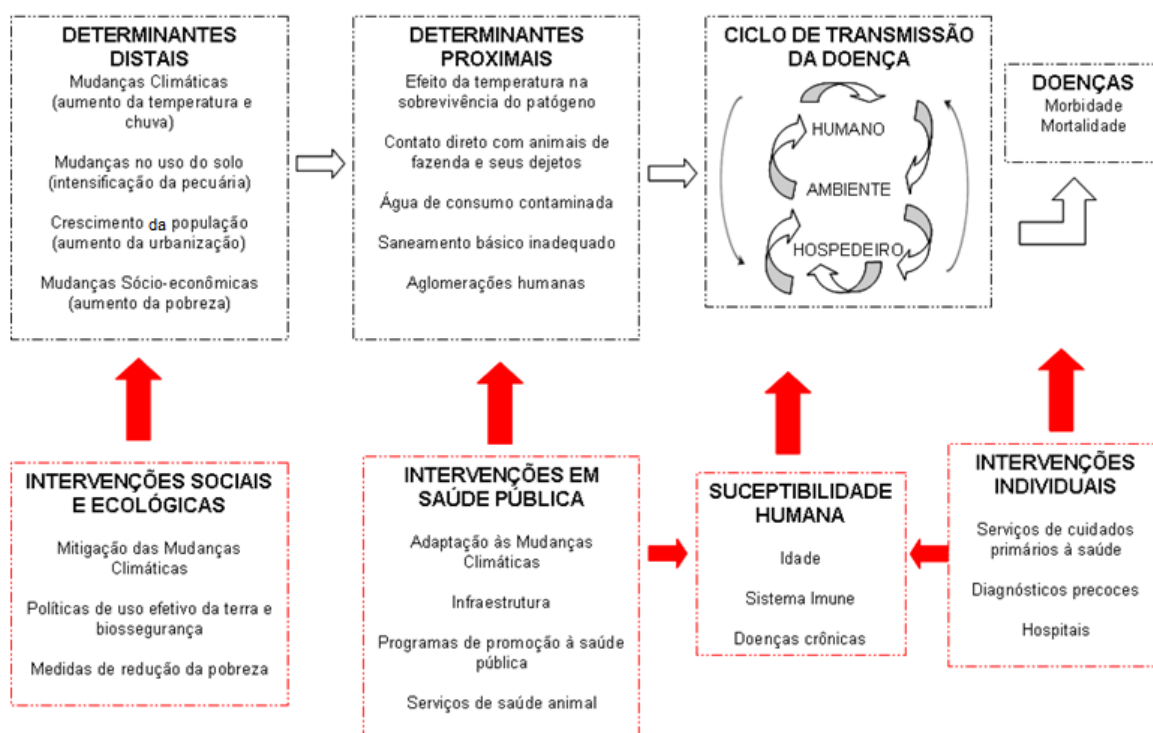


Figura 7. Diagrama mostrando os fatores ambientais e sociais que influenciam a incidência de giardíase e criptosporidiose. Determinantes distais influenciam determinantes proximais que, por sua vez, modificam o ciclo de transmissão da doença de maneira que podem alterar seu risco. O ciclo de transmissão da doença inclui animais hospedeiros e reservatórios ambientais. Intervenções funcionam em múltiplos níveis: ecológicas e sociais para reduzir a carga de patógenos no ambiente, muitas vezes ao nível global (por exemplo, as políticas de uso da terra e atenuação das alterações climáticas), de saúde pública para reduzir a exposição da população a elementos patogênicos e nível individual, intervenções clínicas (cuidados em saúde primária e serviços de diagnóstico).

FONTE: Adaptado de LAL *et al.* (2013).

### 3.8. CRIPTOSPORIDIOSE EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO E CRIAÇÃO

O gado bovino pode ser infectado por quatro espécies de *Cryptosporidium*: *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae*. Estudos realizados nos EUA indicam que existe uma associação entre a idade do animal infectado e a espécie de *Cryptosporidium*. No gado leiteiro, *C. parvum* é mais frequentemente encontrado em bezerros não desmamados, *C. bovis* e *C. ryanae* em bezerros desmamados e *C. andersoni* em gado adulto (FAYER *et al.*, 2006, FAYER *et al.*, 2007; SANTIN *et al.*, 2008).

Um estudo conduzido na Austrália sugere que *C. parvum* está na maioria dos casos ausente em ovelhas. Porém *C. bovis* e o genótipo do *Cryptosporidium* encontrado em cervídeos são os mais comumente encontrados nestes animais (RYAN *et al.*, 2005b). Estes dados são confirmados por estudos realizados nos EUA, Reino Unido, Bélgica e Tunísia (SANTIN *et al.*, 2007; SOLTANE *et al.*, 2007; ELWIN & CHALMERS, 2008; GEURDEN *et al.*, 2008b). Entretanto, alguns estudos no Reino Unido e na Espanha mostram ocorrência exclusiva ou dominante de *C. parvum* em cordeiros (PRITCHARD *et al.*, 2008; MUELLER-DOBLIES *et al.*, 2008; QUILTZ *et al.*, 2008). Nestes estudos, o genótipo do *Cryptosporidium* encontrado em cervídeos e *C. parvum* são mais prevalentes que *C. bovis*. No entanto, parecem existir algumas diferenças de distribuição geográfica entre as espécies de *Cryptosporidium*. Resultados de um estudo, também desenvolvido na Austrália, demonstraram que a dificuldade em identificar *C. parvum* em cordeiros foi devido a uma melhor detecção das espécies dominantes em amostras com populações mistas de parasitos por meio da PCR baseada em rRNA SSU (YANG *et al.*, 2011). Existem poucos estudos sobre genotipagem de *Cryptosporidium* detectado em cabras. Em um estudo na Bélgica, *C. parvum* foi a única espécie encontrada em cabritos (GEURDEN *et al.*, 2008b). *C. bovis* e um novo genótipo de *Cryptosporidium* foram encontrados em dois cabritos na China (KARANIS *et al.*, 2007b).

Outro estudo, desenvolvido na Austrália registrou a ausência de *C. parvum* em porcos e a presença de *C. suis* e de *Cryptosporidium* genótipo II em porco (RYAN *et al.*, 2003b). Dois estudos mostram ainda que *C. suis* infecta preferencialmente leitões que estão em período de amamentação e o genótipo II foi

mais frequentemente encontrado em leitões desmamados (LANGKJAER *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2008).

Abeywardena *et al.* (2013) conduziram um estudo de caracterização molecular de *Cryptosporidium* e *Giardia* encontrados em búfalo asiático (*Bubalus bubalis*) em duas fazendas de criação extensiva na Austrália, e o parasito *Cryptosporidium* foi encontrado nas duas fazendas, sendo a espécie identificada como *C. parvum*. Este foi considerado o primeiro registro para a espécie de hospedeiro em questão.

São escassos os estudos que assinalam a presença de espécies de *Cryptosporidium* em outros animais de criação, contudo, foi citada a infecção em cavalos (CHALMERS *et al.*, 2005; GRINBERG *et al.*, 2008a) e em alpacas (STARKEY *et al.*, 2007; TWOMEY *et al.*, 2008).

No Brasil, a maioria dos trabalhos trata da criptosporidiose em animais de criação, como por exemplo, Sevá *et al.* (2010) que analisaram, por meio de técnicas moleculares, fezes de gado bovino, equinos, porcos, ovelhas e cachorros em São Paulo, com prevalências variando de 3 % a 10,7 %. Os últimos trabalhos realizados no Brasil tratam da ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em gado bovino (FIUZA *et al.*, 2011a), ovelhas (FIUZA *et al.*, 2011b) e bezerros (MEIRELES *et al.*, 2011).

### 3.9. CRIPTOSPORIDIOSE EM ANIMAIS SILVESTRES

Poucos trabalhos sobre criptosporidiose são realizados com animais de vida livre, tanto em ambiente silvestre quanto urbano, bem como, lojas de venda de animais e com animais mantidos em centros de vida selvagem e zoológicos. Mais raros ainda, são estudos em que há abordagem dos aspectos moleculares, prevalência e dinâmica da criptosporidiose. Feng (2010) realizou um trabalho de revisão sobre a presença de *Cryptosporidium* em mamíferos placentários silvestres. O autor ressalta a importância do advento dos estudos moleculares trazendo mais informações sobre especificidade de hospedeiros, potencial de transmissão das diferentes espécies e genótipos entre os animais e entre animais e os seres humanos. Também enfatiza que o protozoário *Cryptosporidium* pode tornar-se um importante problema em saúde pública, pelo fato de seus oocistos causarem contaminação ambiental. O Quadro 3 mostra os trabalhos realizados sobre a prevalência de *Cryptosporidium*, no mundo, em animais silvestres de vida livre.

Quadro 3. Prevalência de *Cryptosporidium* em animais silvestres, em diversas reservas e parques de vida livre do mundo. São identificados o local de coleta das amostras fecais, métodos utilizados e resultados obtidos.

<b>Animal estudado</b>	<b>Local</b>	<b>Método</b>	<b>Resultados</b>	<b>Autores</b>
<i>Trichosurus vulpecula</i> (cusu-comum)	Bosques do Zoológico de Taranga (Austrália)	IMF, PCR, Seq.	Prevalência de 11,3 % (15/133). Identificados os genótipos BTP1 e BTP2	Hill <i>et al.</i> (2008)
<i>Gorilla gorilla gorilla</i> (Gorila)	Parque Nacional Lopé e Parque Nacional Moukalaba-Doudou (Gabão)	ZN, IMF	Prevalência 19 % e 0 % respectivamente	Van <i>et al.</i> (2010)
<i>Loxodonta africana</i> (elefante), <i>Syncerus caffer</i> (búfalo) e <i>Aepycerus melampus</i> (impala)	Parque Nacional Kruger (África do Sul)	ZN, IMF	25,8 %, 5,5 % e 4,3 % respectivamente	Abu Samra <i>et al.</i> (2011)
<i>Macropodus fuliginosus</i> (Canguru cinzento)	Austrália	PCR, Seq.	9,3 % (71/763). <i>C. macropodum</i> , <i>C. xiaoi</i> , <i>C. fayeri</i> e novo genótipo canguru	Yang <i>et al.</i> (2011)
<i>Capreolus capreolus</i> (veado) e <i>Sus scrofa</i> (javali)	Galícia - Espanha	ZN	1,3 % (6/224) e 1,3 % (4/381) respectivamente	Castro-Hermida <i>et al.</i> (2011)
Aves em lojas de animais	China	Sheather PCR, seq.	8,1% (35/434) Sheather. 51,4 % (18/35) <i>C. baileyi</i> ; 14,3 % (5/35) <i>C. galli</i> ; 8,65 % (3/35) <i>C. meleagridis</i> ; 8,6 % (3/35) Genótipo aviário III e 17,1 % (6/35) genótipo aviário V	Qi <i>et al.</i> (2011)
<i>Vulpes vulpes</i> (raposa vermelha) e <i>Ursus arctos</i> (urso-marrom)	Slováquia	Teste de Elisa	Prevalência de 38,7 % (24/62) e 55,6 (35/63) respectivamente	Ravaszova <i>et al.</i> (2012)
<i>Loxodonta africana</i> (elefante), <i>Syncerus caffer</i> (búfalo) e <i>Aepycerus melampus</i> (impala) e <i>Bos taurus</i> (boi doméstico)	Parque Nacional Kruger (África do Sul)	PCR/RFLP, Seq.	Elefantes 0 % (0/72), búfalo 2,8 % (2/71) <i>C. ubiquitum</i> e <i>C. bovis</i> , impala 2,8 % (2/71) <i>C. ubiquitum</i> , boi 4/51-8 % ( <i>C. andersoni</i> e <i>C. bovis</i> ). Animais selvagens 214/4 – 2,8 %	Abu Samra <i>et al.</i> (2013)
<i>Mustela vison</i> (vison americano)	Austrália	PCR, Seq.	5 %, <i>C. andersoni</i>	Stuart <i>et al.</i> (2013)
<i>Prolemur simus</i> (grande-lêmure-dos-bambus) e <i>Microcebus rufus</i> (lêmure-rato)	Parque Nacional Ranomafana (Madagáscar)	IMF	25 % para ambos os primatas.	Rasambainarivo <i>et al.</i> (2013)
<i>Gorilla gorilla gorilla</i> (Gorila)	Área de proteção ambiental de Dzanga Sangha (África)	PCR, Seq.	0,5 % (1/221).	Sak <i>et al.</i> (2013)

Quadro 3. Prevalência de *Cryptosporidium* em animais silvestres, em diversas reservas e parques de vida livre do mundo. São identificados o local de coleta das amostras fecais, métodos utilizados e resultados obtidos. (continuação)

NO BRASIL				
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (capivara)	São Paulo	ZN, PCR, Seq.	5,52 % <i>C. parvum</i>	Meireles <i>et al.</i> (2007)
<i>Leopardus weidii</i> (gato-maracajá)	Cachoeira do Sul (RS)	ZnSO <sub>4</sub>	1 exemplar e positivo	Oliveira <i>et al.</i> (2008)
<i>Tupinambis teguixin</i> (lagarto)	Alegria (RS)	ZnSO <sub>4</sub>	2 animais amostrados e positivos	Silva <i>et al.</i> (2008)
<i>Coendou villosus</i> (ouriço-cacheiro)	Cachoeira do Sul e Porto Alegre (RS)	ZnSO <sub>4</sub>	2 animais amostrados 1 positivo	Soares <i>et al.</i> (2008)
Roedores, marsupiais, saguis, morcegos, lagartos e sapos	Mogi das Cruzes, Salesópolis e Biritiba-Mirim (SP)	Kinyoun	98 amostras 3 positivas	Lallo <i>et al.</i> (2009)
Aves Silvestres	São Paulo	PCR	6,6 %	Sevá <i>et al.</i> , (2011)

Legenda: IMF-imunofluorescência; Seq-sequenciamento; ZN-coloração de Ziehl-Neelsen; ZnSO<sub>4</sub>-Centrífugo-flutuação em ZnSO<sub>4</sub>.

FONTE: A AUTORA, 2014.

Os dados apresentados no Quadro 3 comprovam a carência de trabalhos relativos à criptosporidiose em animais silvestres, principalmente no Brasil. A falta de informação é preocupante, com relação ao manejo de animais em áreas de proteção ambiental. Alguns trabalhos realizados em outros países trazem uma abordagem molecular com a identificação das espécies de *Cryptosporidium* envolvidas nas infecções, sendo, desta forma, possível realizar inferências relativas a aspectos epidemiológicos desta parasitose em ambientes naturais. Já no Brasil, há apenas dois trabalhos utilizando técnicas moleculares, os demais se baseiam em técnicas que não permitem a identificação da espécie envolvida, portanto, tratam de relatos de caso de infecção por *Cryptosporidium* em animais silvestres, sem fazer qualquer tentativa de inferências epidemiológicas, de identificação de fontes de infecção ou da dinâmica de transmissão do parasito.

### 3.10. CRIPTOSPORIDIOSE EM ANIMAIS MANTIDOS EM CENTROS DE TRIAGEM E ZOOLÓGICOS DO MUNDO

Alguns trabalhos foram realizados sobre prevalência, hospedeiros e dinâmica de transmissão de *Cryptosporidium* em animais mantidos em cativeiro. São exemplos: o Zoológico de San Diego (HEUSCHELE *et al.*, 1986), de Barcelona (GOMEZ *et al.*, 1992; GOMEZ *et al.*, 1996; GOMEZ *et al.*, 2000; GRACENEA *et al.*, 2002), de Praga (RYAN *et al.*, 2003a), de Lisboa (ALVES *et al.*, 2005), do Japão (MATSUBAYASHI *et al.*, 2005), de Kuala Lumpur-Malásia (ROHELA *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2008), da Argentina (VENTURINI *et al.*, 2006), de Peña Escrita-Espanha (PÉREZ CORDÓN *et al.*, 2008), da Bélgica (GEURDEN *et al.*, 2009), Zoo Safari de Fasano e Zoológico de Pistóia-Itália (FAGIOLINI *et al.*, 2010; PAPINI *et al.*, 2012), 4 Zoológicos da República Tcheca (KODÁDKOVÁ *et al.*, 2010) e Centro de Resgate Animal de Zhengzhou-China (WANG *et al.*, 2011).

Zoológicos, parques de conservação e centros de reabilitação de animais silvestres são ideais para o estudo da criptosporidiose devido à quantidade de espécies animais que podem ser estudadas ao mesmo tempo, sem necessidade de grandes deslocamentos. Além disso, a alta densidade de animais associada ao estresse do cativeiro pode aumentar a suscetibilidade a doenças. Este tipo de estudo é importante para embasar planos de manejo em zoológicos.

No Zoológico de Barcelona foram realizados estudos em 14 espécies de primatas e 21 espécies de herbívoros, tendo sido encontrado *Cryptosporidium* em todas as espécies amostradas (GOMEZ *et al.*, 1992; GRACENEA *et al.*, 2002). Os autores discutem que a prevalência deste parasito em primatas está relacionada às características físicas (proximidade) dos recintos onde eles são mantidos (FALL *et al.*, 2003).

No Zoológico de Praga onze espécies de mamíferos silvestres foram positivas para *Cryptosporidium*. Com a aplicação de técnicas moleculares (PCR) verificou-se que estes mamíferos albergavam quatro diferentes espécies ou genótipos do parasito, sendo a maioria infectada por *C. parvum* (RYAN *et al.*, 2003a). Portanto, estudos moleculares em *Cryptosporidium* provenientes de animais silvestres, são importantes para refinar o conhecimento dos potenciais hospedeiros, dinâmica de transmissão, seu potencial zoonótico e seus genótipos (APPELBEE *et al.*, 2005).

Cabral *et al.* (2001) realizaram coleta de fezes de animais silvestres, mantidos em cativeiro no Parque Sabiá em Uberlândia (MG). Foram amostrados 117 mamíferos nativos do Brasil, e as fezes analisadas por meio de técnica de coloração, apenas uma amostra proveniente de um puma (*Puma concolor*) foi positiva para *Cryptosporidium*. Os autores concluíram que os níveis de infecção podem ser considerados baixos.

Carvalho Filho *et al.* (2006) coletaram fezes de primatas apreendidos pelas autoridades competentes e mantidos no Centro de Triagem de Vida Selvagem (CETAS) da localidade de Seropédica (RJ). Foram amostrados 4 macacos bugios (*Alouatta fusca*) e 21 saguis (*Callithrix* spp.). Os autores utilizaram técnicas de flutuação (formaldeído-éter) e coloração (azul de metileno-safranina e tricrômica) e 91,7% das amostras coletadas foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium*.

Ludwig & Marques (2008) realizaram a coleta de “pools” de fezes de 23 emas (*Rhea americana*) mantidas no Parque Zoológico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul e utilizaram a coloração de Ziehl-Neelsen modificada. Duas amostras foram positivas. Os mesmos autores, em 2011, realizaram outro trabalho na mesma instituição onde foram coletadas 92 amostras fecais de mamíferos, pertencente às seguintes ordens: Primata, Carnivora, Rodentia, Artiodactyla, Perissodactyla, Xenarthra e Proboscidea. As fezes foram analisadas por meio da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen e 19 amostras foram positivas, provenientes dos seguintes animais: bugio (*Alouatta caraya*), macaco-da-noite (*Aotus nigriceps*), macaco-aranha-de-cara-preta (*Ateles chamek*), puma (*Puma concolor*), Cervo-sambar (*Cervus unicolor*), gamo (*Dama dama*), waterbuck (*Kobus ellipsiprymus*), ouriço-cacheiro (*Coendou prehensilis*) e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) (LUDWIG & MARQUES, 2011).

Silva *et al.* (2008a) examinaram fezes de 18 primatas (4 espécies), oriundos de um zoológico e de uma reserva conservacionista, nas cidades de Cachoeira do Sul e Santa Maria (RS). Com o objetivo de avaliar a presença de protozoários gastrointestinais, foram utilizadas as técnicas de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e coloração por Ziehl-Neelsen, 8 animais apresentaram positividade para oocistos de *Cryptosporidium*, representados pelas seguintes espécies: macaco-prego (*Cebus apella*), rhesus (*Macaca mulata*) e sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*). Os autores destacaram a ausência de sintomatologia desses animais.

Silva *et al.* (2008b) analisaram fezes provenientes de um tamanduá-mirim filhote (*Myrmecophaga tetradactyla*) mantido em um centro conservacionista em Santa Maria (RS) utilizando as técnicas de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e coloração de Zielh-Neelsen. O animal apresentava diarreia e foi positivo para *Cryptosporidium* com alta taxa de infecção.

Silva *et al.* (2008c) analisaram fezes de 338 psitacídeos adultos, pertencentes a oito espécies, provenientes de um criadouro conservacionista e do Zoológico de Cachoeira do Sul (RS). Os autores empregaram as técnicas de centrífugo-flutuação e coloração de Zielh-Neelsen e obtiveram 180 amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium*. E mais, assinalaram o primeiro registro de parasitismo por *Cryptosporidium* nas seguintes espécies: agapornis (*Agapornis fischer*), arara-canindé (*Ara ararauna*), papagaio-charão (*Amazona pretrei*).

SILVA *et al.* (2008d) relataram a presença de *Cryptosporidium* em lagartos (*Tupinambis teguixin*) de vida livre, oriundos do município de Alegria (RS) e consideraram este, o primeiro registro de ocorrência deste parasito nesta espécie. A técnica utilizada para a detecção dos oocistos foi a de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco.

Borges *et al.* (2009) verificaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium* corados pela técnica de Kinyoun, em fezes de um peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus*) mantido no oceanário da Fundação de Mamíferos Aquáticos da Ilha de Itamaraca (PE).

Farret *et al.* (2010) pesquisaram protozoários gastrointestinais em três exemplares adultos de queixada (*Tayassu pecari*) no Rio Grande do Sul, por meio de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e coloração de Kinyoun e, encontraram os seguinte parasitos: *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Giardia* e *Balantidium*.

Cabral *et al.* (2011) examinaram fezes de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) confinadas na fazenda-escola da Universidade Federal de Uberlândia (MG) utilizando a técnica de coloração de Zielh-Neelsen. Das 28 amostras coletadas, 4 foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium*.

Fanfa *et al.* (2011) relataram um estudo de caso em que foram coletadas fezes de um puma (*Puma concolor*) mantido em um criadouro conservacionista na cidade de Santa Maria (RS). Oocistos de *Cryptosporidium* foram identificados, nesta amostra, por meio da coloração de Kinyoun.



Holsback *et al.* (2013) analisaram a frequência de ocorrência e a variedade de parasitos intestinais em mamíferos e aves silvestres de vida livre mantidos em Centros de Reabilitação em Jundiaí (São Paulo) e Campo Grande (Mato Grosso do Sul). Amostras fecais foram coletadas e processadas pelos métodos de sedimentação e de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco. Os autores relataram positividade para enteroparasitos em 71% das amostras. Oocistos de *Cryptosporidium* foram detectados em amostras de fezes de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) e maritacas (*Pionus maximiliani*).

Diante do exposto, verifica-se que os trabalhos realizados no Brasil, com relação à presença de *Cryptosporidium* em animais mantidos em cativeiro, são de relatos de caso com identificação somente do gênero deste protozoário, não sendo possível realizar inferências sobre possibilidade de transmissão zoonótica, identificação das fontes de infecção ou da epidemiologia da parasitose nestes ambientes. Nesses estudos foram utilizadas técnicas de coloração, não há registro de trabalhos, baseados em técnicas moleculares para diagnóstico da criptosporidiose em animais mantidos em zoológicos brasileiros. No nosso estudo foi realizada a detecção e identificação molecular das espécies de *Cryptosporidium* presentes em fezes de animais e na água dos lagos dos recintos, com a finalidade de auxiliar nos planos de manejo do Zoológico Municipal de Curitiba e provocar a discussão sobre a importância deste parque como fonte de contaminação de mananciais e pensar medidas mitigadoras para este risco ambiental.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O Zoológico Municipal de Curitiba, inaugurado em 1982, é uma das Áreas de Preservação Permanente (A.P.P.) mais visitada do país. O público visitante é expressivo (em média 10 mil pessoas por final de semana e aproximadamente 650 mil visitantes por ano). Ele ocupa 530.000 m<sup>2</sup> do Parque Municipal do Iguaçu, e nele convivem 1303 animais (490 aves, 195 mamíferos e 618 répteis), totalizando 136 espécies (87 de aves, 41 de mamíferos e 8 de répteis) (Figura 8). Este parque está situado na Bacia Hidrográfica do Rio Iguaçu, sendo margeado por suas águas. A Bacia do Rio Iguaçu é considerada a maior do Estado do Paraná com 70.800 Km<sup>2</sup>, desta área, 80,4 % estão situados no Paraná, 16,5 % em Santa Catarina e 3 % na Argentina. Na Bacia do Iguaçu há aproximadamente 4.541.698 habitantes, os quais representam 44,2 % da população do Estado do Paraná. A população urbana é de 3.875.718 habitantes, com taxa de urbanização de 85,3 %. A demanda de recursos hídricos desta bacia é de 25,8 m<sup>3</sup>/s, correspondendo a 28 % de todo o consumo de água do Paraná (SEMA, 2010).

No Zoológico Municipal de Curitiba é possível observar a presença de animais de vida livre como aves migratórias, quatis, serelepes, macacos bugios que visitam este espaço, uma vez que se trata de um parque aberto que tem ao seu redor um maciço de Floresta com Araucária.

Os recintos dos animais que constituem o plantel do Zoológico Municipal de Curitiba estão adequados o mais próximo possível do habitat natural dos animais neles mantidos (Figura 9A). A alimentação dos animais é elaborada por veterinários, biólogos e zootecnistas (Figura 9B). Todos os alimentos ofertados são inspecionados pelo Ministério da Agricultura e apresentam bom padrão de qualidade. A oferta de hortaliças e verduras respeita as variações sazonais.

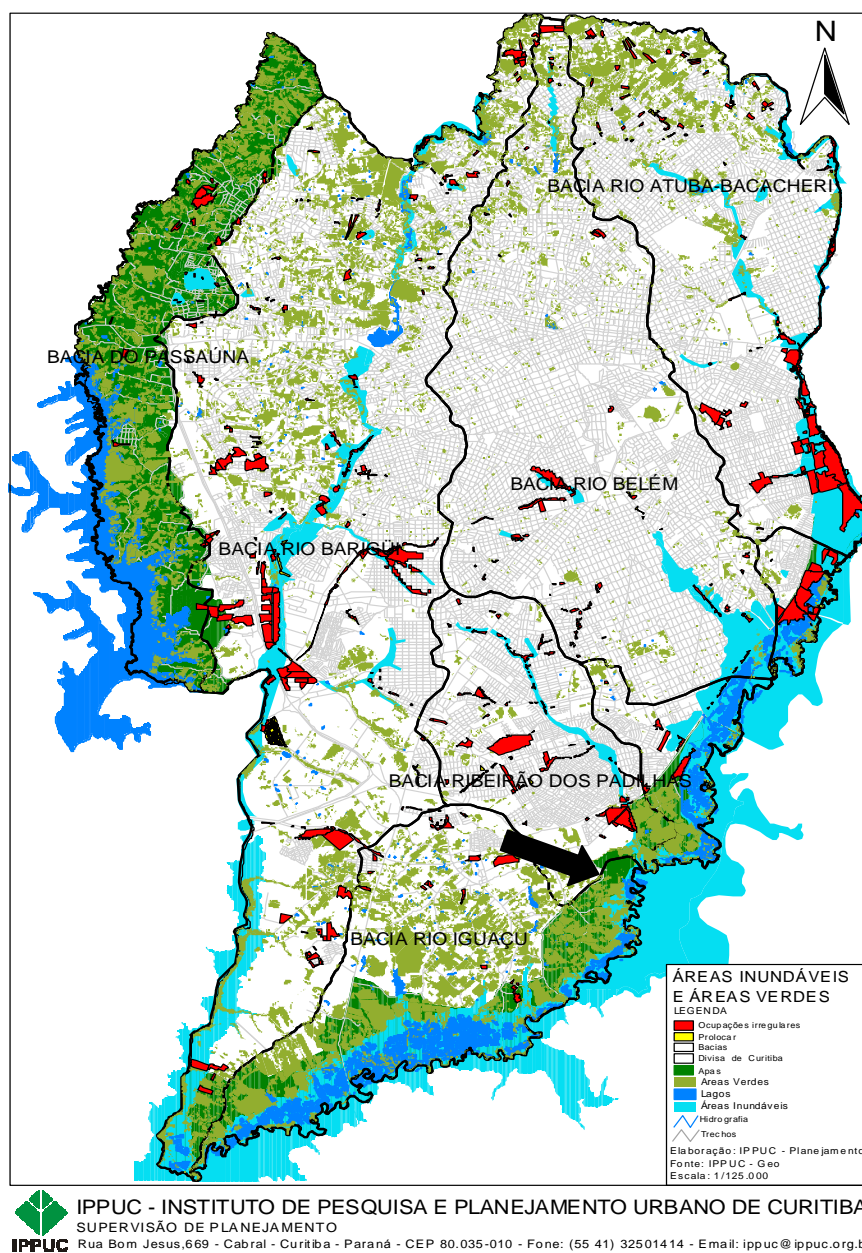


Figura 8. Mapa da cidade de Curitiba, a seta indica o Parque Iguaçu, no qual está situado o Zoológico Municipal de Curitiba.  
 FONTE: IPPUC – Instituto de Pesquisa e Planejamento Urbano de Curitiba, 2010.

A alimentação dos animais é realizada duas vezes ao dia. Cada tratador é responsável por um setor específico. Este tratador também realiza a higienização dos recintos e verifica se há algo que fuja dos padrões. Quando há algo que deva ser informado aos biólogos e veterinários é feito um registro em caderno próprio (Figura 9C). Há recintos no setor expositivo (liberado para a visitação do público), bastante amplos e com grande cobertura de vegetação nativa (Floresta com Araucária) (Figura 9D). Outros são menores e apresentam piso de cimento e/ou areia e são totalmente telados (Figuras 9E e 9F). Todos os recintos possuem pontos de água tratada circulante proveniente da SANEPAR (Companhia de Saneamento do Paraná) (Figura 9G).

Há um setor denominado extra, nele estão animais que não tem recintos disponíveis no setor expositivo e também aqueles que não apresentam condições físicas ou comportamentais para ficarem expostos ao público visitante. Este setor possui alguns recintos mais antigos em que a água disponibilizada é colocada em cochos de cimento. Nos recintos mais novos a água ofertada para os animais já é canalizada (Figuras 9H e 9I).

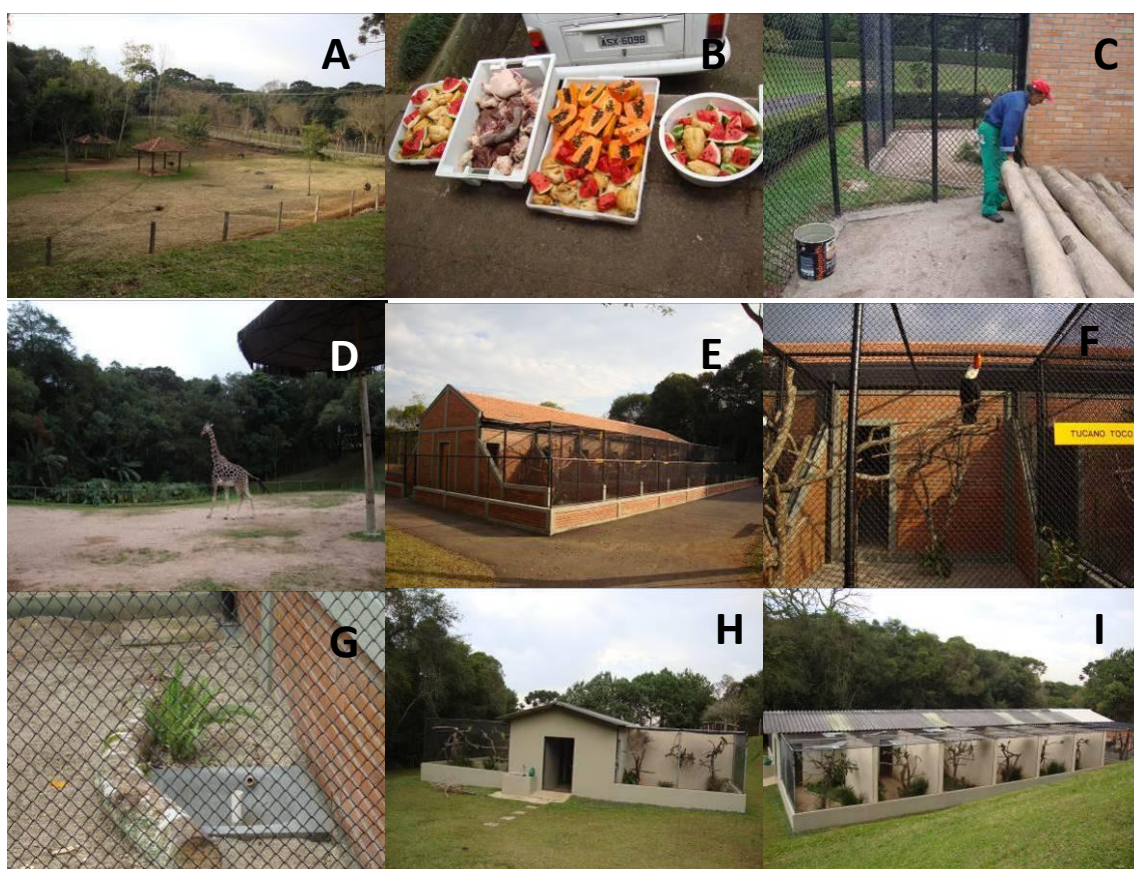


Figura 9. Zoológico Municipal de Curitiba. A- Recintos amplos. B- Dieta dos animais. C- Higienização dos recintos. D- Recinto com ampla cobertura vegetal. E/F. Recintos menores. G- Ponto de água. H/I- Setor extra. FONTE: A AUTORA, 2014.

## 4.2. COLETA DAS AMOSTRAS DE FEZES

As coletas das amostras de fezes foram realizadas no período da manhã, de março a dezembro de 2011, sempre com a presença e ajuda de um tratador de animais e respeitando todas as normas de segurança do parque. Primeiramente, era realizada a limpeza do recinto, retirando restos de alimentos e fezes do dia anterior, ou da noite. Em seguida, a alimentação da manhã era oferecida e aguardava-se o momento da defecação para a coleta do material fecal fresco.

Nos recintos onde havia somente um animal, coletou-se o material fecal presente no ambiente, com o auxílio de uma espátula de plástico descartável. Nos recintos onde existia mais que um animal, houve necessidade de observação do momento da defecação e posterior identificação do animal. As fezes foram coletadas do chão (sempre após a limpeza dos recintos, a fim de evitar contaminação ambiental), ninhos ou poleiros, com auxílio de uma espátula de plástico.

Os grupos de mamíferos e aves dos quais as amostras fecais foram coletadas estão descritos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Grupos de mamíferos dos quais as amostras fecais foram coletadas.

ORDEM	FAMÍLIA	Nº DE AMOSTRAS	ESPÉCIE
XENARTHA	Myrmecophagidae	2	Tamanduá-bandeira ( <i>Myrmecophaga tridactyla</i> )
		1	Lobo-guará ( <i>Chrysocion brachyurus</i> )
	Canidae	1	Cachorro-do-mato ( <i>Cerdocyon thous</i> )
		2	Urso-de-óculos ( <i>Tremarctos ornatus</i> )
	Ursidae	2	Mão-pelada ( <i>Procyon cancrivorus</i> )
		4	Lontra ( <i>Lontra longicaudis</i> )
	Procyonidae	1	Ariranha ( <i>Pteronura brasiliensis</i> )
		1	Irara ( <i>Eira barbara</i> )
	Mustelidae	1	Furão ( <i>Galictis cuja</i> )

Tabela 1. Grupos de mamíferos dos quais as amostras fecais foram coletadas.  
(Continuação)

		5	Leão ( <i>Panthera leo</i> )
		5	Onça-pintada ( <i>Panthera onca</i> )
	Felidae	3	Puma ( <i>Puma concolor</i> )
		3	Jaguaririca ( <i>Leopardus pardalis</i> )
		3	Gato-maracajá ( <i>Leopardus wiedii</i> )
		2	Gato-do-mato-pequeno ( <i>Leopardus tigrinus</i> )
PERISSODACTYLA	Equidae	1	Zebra ( <i>Equus burchelli</i> )
	Tapiridae	2	Anta ( <i>Tapirus terrestris</i> )
	Camelidae	7	Lhama ( <i>Lama glama</i> )
		2	Guanaco ( <i>Lama guanicoe</i> )
	Cervidae	19	Cervo-nobre ( <i>Cervus elaphus</i> )
		6	Veado-pardo ( <i>Mazama gouazoubira</i> )
ARTIODACTYLA	Giraffidae	2	Girafa ( <i>Girafa camelopardalis</i> )
		2	Bisão-europeu ( <i>Bison bonasus</i> )
	Bovidae	1	Waterbuck ( <i>Kobus ellipsiprymnus</i> )
		6	Nilgai ( <i>Boselaphus tragocamelus</i> )
	Cebidae	19	Cebus sp. (macaco-prego)
		6	Mico-leão-de-cara-dourada ( <i>Leontopithecus chrysomelas</i> )
		4	Cuxiu ( <i>Chiropotes satanas</i> )
	Pitheciidae	1	Zogue-zogue ( <i>Callicebus moloch</i> )
		2	Sagui-de-tufo-preto ( <i>Callithrix penicillata</i> )
PRIMATA		2	Sagui-de-tufo-preto ( <i>Callithrix jacchus</i> )
	Atelidae	3	Macaco-aranha-de-testa-branca ( <i>Ateles marginatus</i> )
		1	Macaco-aranha-de-peito-branco ( <i>Ateles belzebuth</i> )
	Cercopithecidae	5	Babuino-sagrado ( <i>Papio hamadryas</i> )
	Panidae	1	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
TOTAL	17	128	

Tabela 2. Grupos de aves das quais as amostras fecais foram coletadas.

ORDEM	FAMÍLIA	Nº DE AMOSTRAS	ESPÉCIE
STRUTHIONIFORMES	Rheidae	11	Ema ( <i>Rhea americana</i> )
	Struthionidae	4	Avestruz ( <i>Struthio camelus</i> )
	Dromiceidae	11	Emu ( <i>Dromaius novaehollandiae</i> )
	Casuaridae	2	Casuar ( <i>Casuarus casuarius</i> )
PICIFORMES	Ramphastidae	2	Tucano-do-bico-verde ( <i>Ramphastos dicolorus</i> )
		2	Tucano-toco ( <i>Ramphastos toco</i> )
PSITTACIFORMES	Psittacidae	4	Arara-azul-grande ( <i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> )
		9	Arara-canindé ( <i>Ara ararauna</i> )
		3	Arara-piranga ( <i>Ara macao</i> )
		5	Arara-vermelha ( <i>Ara chloroptera</i> )
		7	Ararajuba ( <i>Guaruba guarouba</i> )
		10	Papagaio-verdadeiro ( <i>Amazona aestiva</i> )
		2	Papagaio-do-mangue ( <i>Amazona amazonica</i> )
		16	Papagaio-chauá ( <i>Amazona rhodocorita</i> )
		10	Papagaio-do-peito-roxo ( <i>Amazona vinacea</i> )
		10	Papagaio-da-cara-roxa ( <i>Amazona brasiliensis</i> )
		3	Papagaio-galego ( <i>Amazona xanthops</i> )
STRIGIFORMES	Tytonidae	2	Coruja-suindara ( <i>Tyto alba</i> )
	Strigidae	1	Murucututu ( <i>Pulsatrix perspicillata</i> )
		1	Murucututu-de-barriga-amarela ( <i>Pulsatrix koeniswaldiana</i> )
		3	Mocho-orelhudo ( <i>Rhinoptynx clamator</i> )
CATHARTIFORMES	Cathartidae	3	Urubu-rei ( <i>Sarcoramphus papa</i> )
TOTAL	9	121	



Um total de 249 amostras fecais foi coletado, sendo 128 provenientes de mamíferos e 121 de aves. As fezes foram armazenadas em coletores de plástico, envoltos em sacos plásticos individuais, devidamente identificados. As amostras foram mantidas em isopor com gelo e transportadas para o Laboratório de Parasitologia Molecular (Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná) para o processamento.

#### 4.3. COLETA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

A coleta das amostras de água foi realizada no período de janeiro a março de 2012. Seis coleções aquáticas foram amostradas dentro do zoológico: Coleção Aquática 1 (recinto dos cervos-nobre – amostras 1,2,3), Coleção Aquática 2 (recinto das lontras – amostras 4,5,6), Coleção Aquática 3 (recinto das aves aquáticas – amostras 7,8,9), Coleção Aquática 4 (lagoa do sapatão – amostras – 10,11,12), Coleção Aquática 5 (recinto dos macacos-aranha – amostras 13,14,15) e Coleção Aquática 6 (recinto dos macacos-prego – amostras 16,17,18) (Figuras 10 e 11).

Em cada uma das coleções aquáticas foram coletadas, por meio de um puçá plástico, três amostras de água no volume de 2,1 L totalizando 6,3 L. As amostras foram acondicionadas em garrafas plásticas e transportadas ao laboratório de Parasitologia Molecular (Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná) para o processamento.

Durante a coleta das amostras de água, a temperatura do ar e a da água foi registrada por meio de um termômetro de mercúrio da marca Incoterm. Para aferir a temperatura do ar, o termômetro foi protegido em uma caixa de papelão a fim de evitar a sua exposição direta ao sol. Também foi aferida a quantidade de oxigênio dissolvido, utilizando um oxímetro com calibração manual à prova d'água e com cabo de 4 metros (Modelo HI 9142N HANNA).



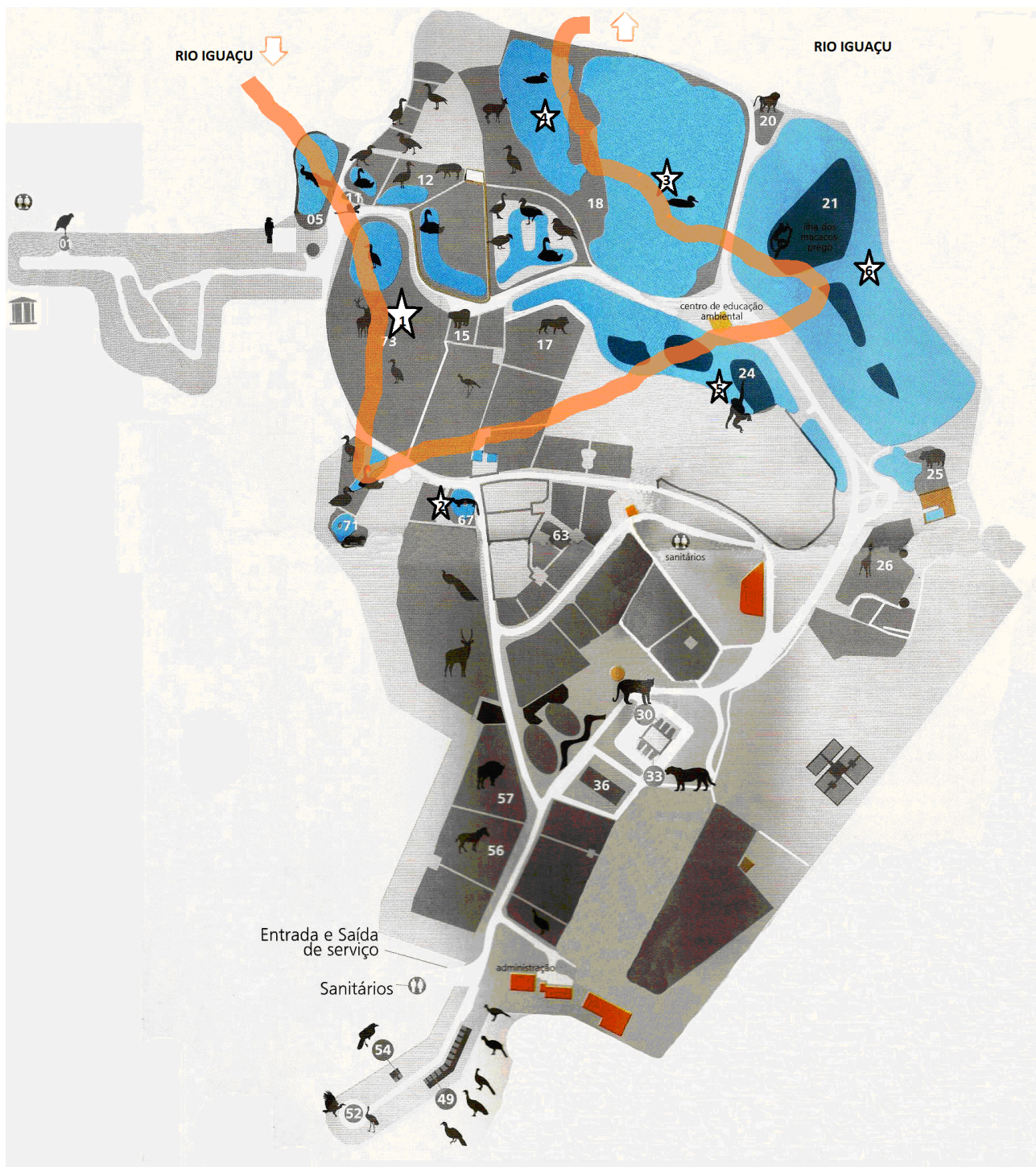


Figura 10. As marcações identificam os locais de coleta das amostras de água no Zoológico Municipal de Curitiba: 1- Recinto dos cervos-nobre. 2- Recinto das lontras. 3- Recinto das aves aquáticas. 4- Lagoa do Sapatão. 5- Recinto dos macacos-aranha. 6- Recinto dos macacos-prego. A linha laranja mostra o trajeto das águas do rio Iguaçu no interior do parque.  
 FONTE: Adaptado do Folder de orientação ao visitante do Zoológico Municipal de Curitiba – Secretaria Municipal do Meio Ambiente (2011).



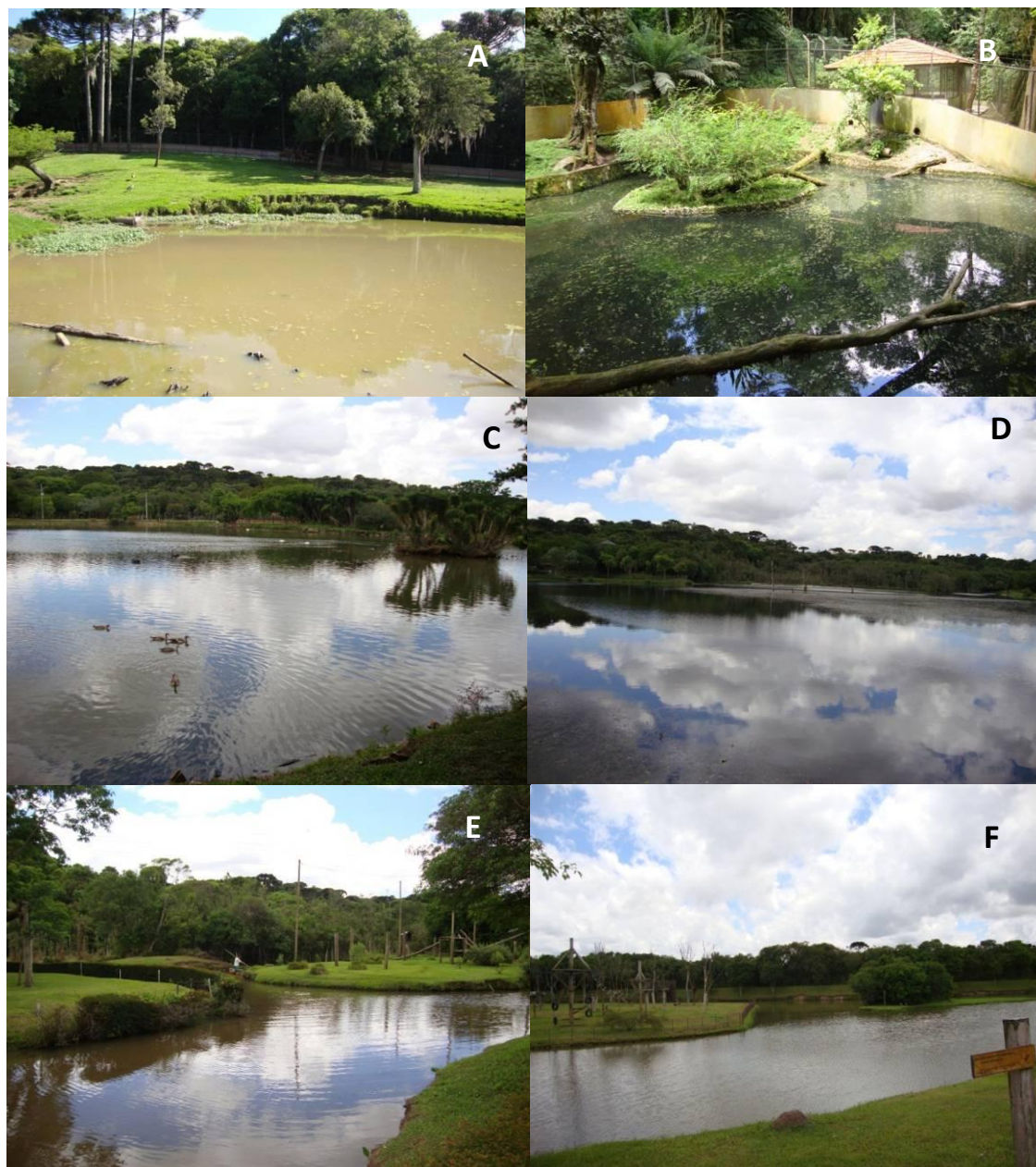


Figura 11. Foto dos pontos de coleta de água. A- Coleção Aquática (recinto dos cervos-nobre) 1. B- Coleção Aquática 2 (recinto das lontras). C- Coleção Aquática 3 (recinto das aves aquáticas). D- Coleção Aquática 4 (Lagoa do Sapatão). E- Coleção Aquática 5 (recinto dos macacos-aranha). F- Coleção Aquática 6 (recinto dos macacos-prego).  
 FONTE: A AUTORA, 2014.

#### 4.4. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

##### 4.4.1. Amostras de oocistos usados como controle positivo e de fezes

As amostras de oocistos, usados como controle positivo para as extrações de DNA e processos de contaminação de água, a fim de verificar a eficácia da técnica de recuperação de oocistos de *Cryptosporidium*, em membrana de acetato-celulose, foram cedidos pela Profa. Dra. Márcia Benedita, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, provenientes de gado bovino naturalmente infectado, os quais foram purificados com emprego da técnica de gradiente de sacarose.

Para detectar a presença de oocistos de *Cryptosporidium* nas fezes dos animais do Zoológico Municipal de Curitiba, as amostras obtidas foram processadas pela técnica de flutuação em Cloreto de sódio - NaCl (KAR *et al.*, 2011) e esfregaços de fezes em lâminas de microscopia foram confeccionados para a realização da coloração de Ziehl-Neelsen modificada (QUADROS *et al.*, 2006).

Cada amostra de fezes com peso aproximado de 2 gramas, foi diluída em 10 mL de água destilada e filtrada em gaze dobrada em quatro para um tubo cônico de 50 mL. Após, a gaze foi lavada com água destilada até completar o volume de 40 mL. O material fecal filtrado foi centrifugado a 3000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, deixando 5 mL de sedimento. Esse volume foi usado para três procedimentos: alíquotas de 0,5 mL e 1,0 mL foram colocadas em microtubos com volume de 1,5 mL e congeladas a - 20 °C (para posterior extração de DNA), 100 µL foram utilizados para a confecção de esfregaços de fezes em lâminas de microscopia e 1 mL para purificação com NaCl.

Os esfregaços de fezes para a coloração de Ziehl-Neelsen modificado foram confeccionados com um volume de 100 µL do sedimento resultante da centrifugação, com o auxílio de uma espátula de plástico. Após secos em temperatura ambiente foram fixados com metanol (5 minutos), corados com fucsina de Ziehl (20 minutos), descorados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 %) por 30 segundos, lavados com água destilada e contra corados com verde de malaquita (5 %), por 1 minuto, novamente lavados e deixados para secar em temperatura ambiente (Anexo A).

A leitura das lâminas foi realizada ao microscópio óptico de luz branca em 400X e, em caso de suspeita da presença de oocistos de *Cryptosporidium* em

1000X com objetiva de imersão. Para auxiliar no diagnóstico, uma lâmina de controle positivo, corada com a mesma técnica, serviu como parâmetro.

Para realizar a purificação de oocistos de *Cryptosporidium* foram colocados 10 mL de solução de NaCl ( $d=1,18$ ) em um tubo cônico de 15 mL e adicionado 1 mL de sedimento fecal. O tubo foi fechado e invertido duas vezes para homogeneização. Foi sobreposto 1 mL de água destilada gelada e centrifugado a 2300 g por 10 minutos. A camada entre a água destilada e a solução de NaCl foi coletada e repassada para um tubo de 15 mL. Em seguida, 10 mL de PBS foram adicionados e novamente centrifugou-se nas mesmas condições, este último procedimento foi repetido mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (de aproximadamente 1 mL) transferido para um microtubo de 2 mL, centrifugado a 5000g por 10 minutos e descartado o sobrenadante (Anexo B). Todas as amostras foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de DNA.

#### 4.4.2. Amostras de água

Após a coleta de 3 amostras de 2,1 L, de cada um dos pontos de coleta, uma aliquota de 100 mL de água foi enviada para o Laboratório da USAV (Unidade de Serviço de Avaliação de Conformidades) da SANEPAR, a fim de determinar parâmetros físico, químicos e biológicos da água. O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado por meio do método eletrométrico, utilizando o medidor de pH por calibração HI 221 da marca HANNA instruterm. Para aferir a turbidez da água foi utilizado um turbidímetro da marca Hach, modelo DR 2100-P e para a determinação da cor foi utilizado um aquatester, da marca Orbeco-Hellige com disco de cor Orbeco-Hellige (escala 0 a 25, resolução 2,5). A presença de cianobactérias e plantas (macrófitas) foi pesquisada.

Para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* realizou-se a técnica de filtração em membrana de acetato-celulose ( $0,45\ \mu\text{m}$  - marca Millipore), com o auxílio de uma bomba a vácuo. Foram filtrados 2 L de água, para cada uma das amostras coletadas. Quando saturadas, as membranas foram substituídas, transferidas em placas de Petri esterilizadas, onde foram lavadas com PBS para desprendimento do sedimento. O volume final foi de 40 mL, o qual foi transferido para um tubo cônico de 50 mL. Após centrifugação, uma alíquota do sedimento de

100 µL deste material foi utilizada para a confecção de esfregaços em lâmina de microscopia para a coloração de Ziehl-Neelsen modificada. O restante da alíquota foi utilizada para a técnica de flutuação em NaCl, como descrito no item 4.4.1.

Para monitorar a recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* em sistema de membrana filtrante, duas amostras de 2 L de água ultrapura e esterilizada foram contaminadas com  $10^4$  e  $10^3$  oocistos e submetidas ao mesmo protocolo de filtração das amostras de água coletadas.

#### 4.5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

##### 4.5.1. Extração de DNA

Todas as amostras de fezes e água coletadas foram submetidas ao protocolo de extração de DNA ChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Invitrogen™), após processo de purificação em NaCl.

Primeiramente, adicionou-se 1 mL de tampão de lise aos microtubos com as amostras os quais foram submetidos a 15 ciclos de congelamento em freezer (- 80 °C) e descongelamento (+ 55 °C) em banho-maria para lisar a parede dos oocistos.

Em seguida, foram adicionados 20 µL de proteinase K em cada amostra, as quais foram agitadas mecanicamente e incubadas a 55 °C por 2 horas, em banho-maria, em agitação. Depois foram adicionados 10 µL de RNase A a cada amostra, homogeneizadas por inversão e incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos.

Na sequência foram utilizados 120 µL de partículas magnéticas, homogeneizadas por 5 vezes com o auxílio de uma pipeta e adicionados 100 µL de tampão de purificação, homogeneizando cada amostra por 10 vezes, com auxílio de uma pipeta. Os tubos foram colocados em uma estante magnética por dois minutos, o sobrenadante foi retirado e descartado. Depois os tubos foram retirados da estante e as partículas magnéticas foram lavadas 2 vezes com 1 mL de tampão de lavagem, como auxílio de uma pipeta.

Novamente, os tubos foram colocados na estante magnética por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 150 µL de tampão de eluição, homogeneizado e incubado por 5 minutos a + 55 °C. Os tubos foram colocados em uma estante magnética por 2 minutos sendo efetuada a remoção do material eluído

(contendo o DNA) para microtubos de 600 µL (Anexo C). As amostras foram armazenadas a – 20 °C. Controles positivos (com um oocisto de *Cryptosporidium*) e negativos de extração foram realizados e submetidos aos mesmos procedimentos.

#### 4.5.2. PCR1

A PCR para o diagnóstico de *Cryptosporidium* foi realizada utilizando um par de iniciadores genéricos (XIAOF - 5' TTCTAGAGCTAATACATCCG5' e XIAOR - CCCATTTTC CTTCGAAACAGGA3') (XIAO *et al.*, 1999) da região hiper-variada do gene 18SSU rDNA. As concentrações dos reagentes utilizados foram as seguintes: Tampão 1X, MgCl<sub>2</sub> 3 Mm, dNTP 0,2 mM, Iniciador XIAO F 20 pMol/µL, Iniciador XIAO R 20 pMol/µL, Taq Platinum Polimerase 1,25 U, Triton 0,1 %, água ultrapura (qsp), DNA 5 µL, em um volume final de 25 µL. As condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, amplificação por meio de 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos, 72 °C por um minuto e um ciclo de 72 °C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram armazenados a – 20 °C. Os iniciadores utilizados amplificam um fragmento de DNA de 1325 pares de bases.

#### 4.5.3. Nested – PCR para detecção de *Cryptosporidium*

Para a reação de Nested-PCR utilizou-se um segundo par de iniciadores (XIAOnF-5' AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA e XIAONR-5' GGAAGGGTTGT ATTTATTAGATAAAG3'), também de uma região hiper-variada do gene 18SSU rDNA (XIAO *et al.*, 1999). As condições utilizadas para a Nested-PCR foram as mesmas da PCR convencional, os iniciadores utilizados amplificam um fragmento de DNA de 826 a 864 pares de bases.

#### 4.5.4. PCR2

Os iniciadores internos da Nested - PCR acima foram também utilizados para PCR de etapa única, realizada nas mesmas condições (item 4.5.2.), devido a falta de reprodutibilidade dos resultados das técnicas de PCR e Nested-PCR.

#### 4.5.5. Eletroforese

Os produtos amplificados por PCR e N-PCR foram submetidos em uma voltagem de 70 V e visualizados após eletroforese no gel de agarose 1,6 % em tampão TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM).

No gel foram aplicados 5 µL dos produtos de PCR ou N-PCR junto com 1 µL de tampão a amostra (bromofenol).

Para avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen™).

Após a separação dos produtos de PCR e N-PCR por eletroforese, o DNA foi corado com brometo de etídio durante 20 minutos e visualizado em fonte ultravioleta com exposição de 10 segundos e, em seguida, fotodocumentado.

Alternativamente, foi também usada a eletroforese em gel de poliacrilamida preparado a 5 % em tampão TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM). No gel foram aplicados 5 µL dos produtos de PCR, N-PCR ou PCR com iniciadores XIAOn R e F junto com 1 µL de bromofenol. A voltagem aplicada foi de 80 V. Para avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado marcador de peso molecular (massa molecular de DNA) de 100 pares de bases kb (Invitrogen™).

Após a separação dos produtos de PCR, N-PCR e PCR com iniciadores XIAOn F e R, o gel foi corado com nitrato de prata, visualizado e fotografado com auxílio de um transluminador (Anexo D).

#### 4.6. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO

As amostras positivas para os produtos de amplificação foram purificadas empregando-se o kit de purificação QIAquick® para gel de agarose em microcentrífuga (Anexo E), antes de serem submetidas ao procedimento de sequenciamento.

#### 4.7. SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS

Os produtos amplificados após o processo de purificação foram quantificados (Nano Drop 1000, Thermo Scientific) e normalizados a 200 ng/μL com um volume final de 50 μL. A partir dessa diluição, 10 μL do volume total foi purificado com 2 μL da enzima ExoSap. Depois de adicionada a enzima, a solução foi incubada a 37 °C por 1 hora e a enzima foi inativada a + 80 °C durante 20 minutos (COSTA-RIBEIRO, 2006).

Para a reação de sequenciamento, 1 μL do produto purificado foi utilizado para uma concentração final de 200 ng/μL. As concentrações dos reagentes utilizados foram: tampão, BigDye®, iniciador F 10 pMol/μL, iniciador R 10 pMol/μL, produto amplificado 200 ng/μL, água ultrapura, para um volume final de 10 μL.

As condições utilizadas foram: 1 ciclo a 96 °C por 1 minuto, 25 ciclos a 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos, 60 °C por 4 minutos e 1 ciclo de 4 °C por tempo indeterminado.

Em seguida, foi realizada a precipitação da reação do sequenciamento com 80 μL de isopropanol 65% (Costa-Ribeiro, 2006). Fez-se homogeneização e posteriormente incubação por 20 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação a 19000 g por 25 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e sobre o *pellet* foram adicionados 200 μL de etanol 70%. Novamente o material foi centrifugado a 19000 g durante 10 minutos e todo o sobrenadante foi removido e deixado o *pellet* para secar na estufa. Depois de seco foi resuspenso em 3 μL de formamida e colocado no sequenciador (modelo ABI 3730XL).

#### 4.8. ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO

Das 6 amostras isoladas de DNA isoladas e submetidas ao protocolo de sequenciamento foram obtidas cinco sequências consensos com 610 bp do gene 18SSU rRNA em formato FASTA. Amostras de *Cryptosporidium* utilizadas como controle nos experimentos também foram sequenciadas. As amostras sequenciadas foram submetidas à edição e alinhamento manual múltiplo por meio do programa CLUSTALW2 e Web PRANK beta. Após editadas, as sequências foram importadas para o programa Geneious 5.1 para a construção de uma árvore filogenética e



também foram submetidas ao programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação da espécie ou genótipo de *Cryptosporidium*.

Na Figura 12 é mostrado um fluxograma das diversas formas que podem ser utilizadas para a realização de análises filogenéticas e construção de árvores (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003; SULLIVAN & JOYCE, 2005). As consideradas mais robustas são as que se baseiam nas premissas Bayesianas utilizadas no presente trabalho.

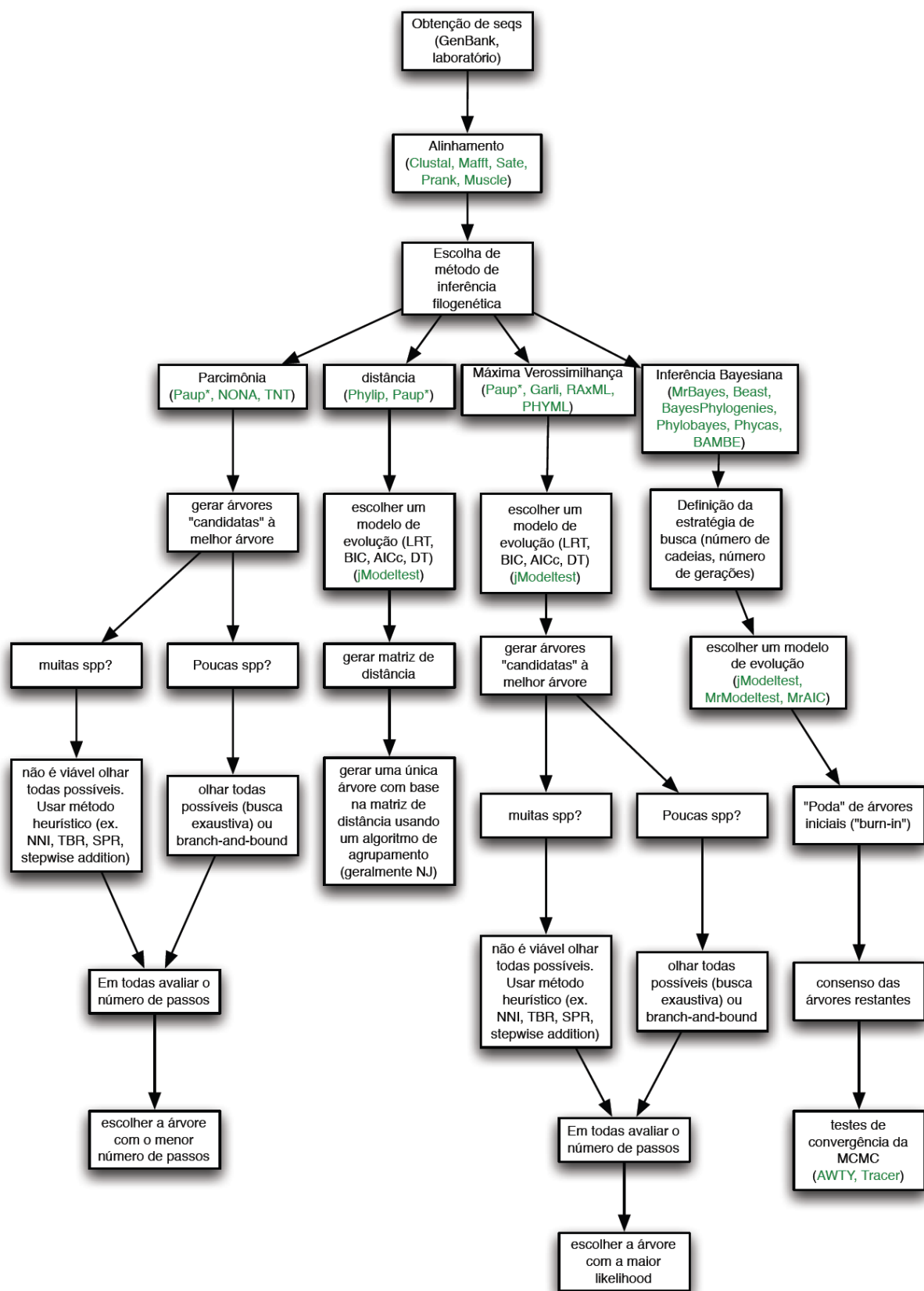


Figura 12. Fluxograma listando as diversas formas de construções filogenéticas.  
FONTE: Adaptação de vários autores.

No programa Geneious 5.1 foi realizada uma análise Bayesiana das amostras sequenciadas, de acordo com a Figura 13.

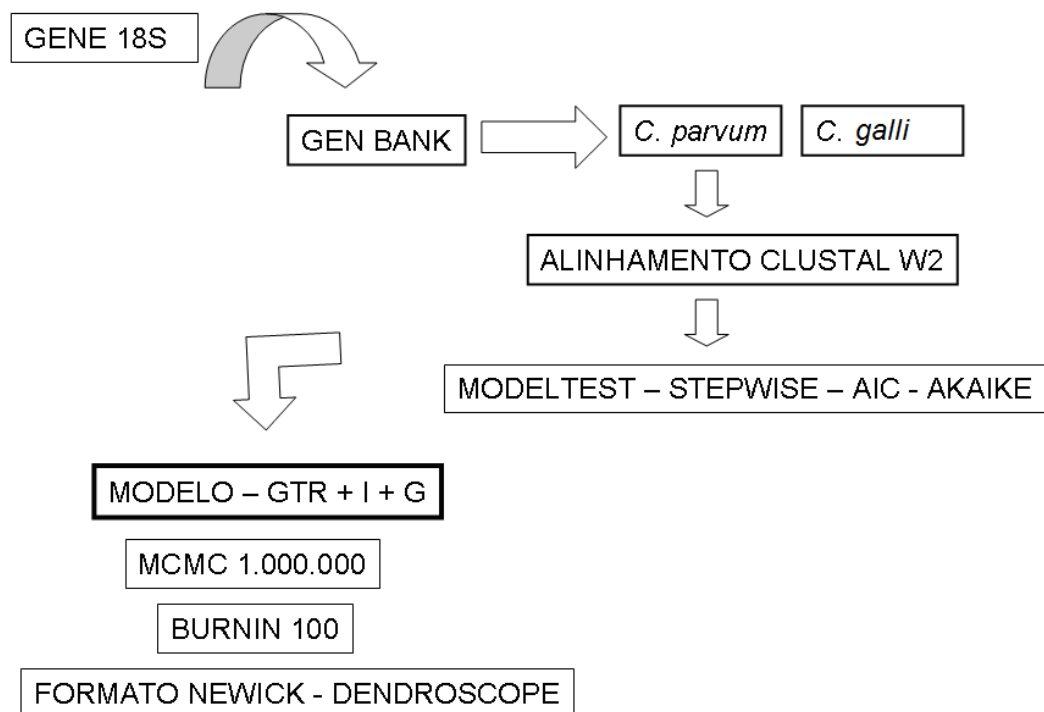


Figura 13. Resumo esquemático dos modelos seguidos para a realização da Análise Filogenética Bayesiana.  
FONTE: A AUTORA.

#### 4.9. COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

O trabalho realizado seguiu todos os critérios estabelecidos nos protocolos veterinários estabelecidos no Departamento de Pesquisa e Conservação da Fauna (MAPCF) da Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SMMA). Com a total anuência e liberação para a entrada nos recintos dos animais e coleta do material biológico pela equipe técnica e direção do setor (ANEXO F).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* EM FEZES DE ANIMAIS

#### 5.1.1. Coloração de Ziehl-Neelsen modificada

Do total de 128 amostras de esfregaços realizados com material fecal de mamíferos (Tabela 1), nenhuma apresentou positividade para oocistos de *Cryptosporidium*, por meio da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada.

Do total de 121 esfregaços realizados com o material fecal coletado de aves duas amostras, uma de ararajuba (*Guaruba guarouba*) e uma de papagaio-da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) apresentaram positividade para oocistos de *Cryptosporidium*, por meio da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada (Tabela 3). O percentual de infecção foi de 1,65 % do total de aves amostradas.

Tabela 3. Resultado das amostras de fezes de mamíferos e aves do Zoológico Municipal de Curitiba, positivas pelas técnicas de: coloração de Ziehl-Neelsen modificada, PCR1, n-PCR e PCR2.

	Número de amostras	ZN	PCR1	n-PCR	PCR2
<b>MAMÍFEROS</b>	128	-	-	-	-
<b>AVES</b>	121	2	3	3	4
<i>Guaruba guarouba</i>	7	+	+	+	+
<i>Amazona vinacea</i>	10	-	-	-	+
<i>Amazona brasiliensis</i>	10	+	+/+	+/+	+/+
<b>TOTAL</b>	249	2	3	3	4

Legenda: (-) negativo; (+) positivo; (+/+) 2 espécimes positivos. ZN = Ziehl-Neelsen modificada. PCR = Polymerase Chain Reaction; N-PCR = Nested – Polymerase Chain Reaction.

Na Figura 14 são mostradas as espécies de aves da Família Psittacidae identificadas como positivas para a infecção por *C. galli*.



Figura 14. Espécies de aves da Família Psittacidae identificadas como positivas para infecção por *C. galli*. A- Ararajuba (*Guaruba guarouba*). B- Papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*). C- Papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*).  
FONTE: A AUTORA

#### 5.1.2. PCR1 e N-PCR

Três amostras fecais de aves foram positivas nas reações PCR1 e n-PCR: uma de ararajuba (*Guaruba guarouba*) e duas de papagaios-da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*).

Quando empregada a PCR2, uma amostra adicional de um papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), além das citadas anteriormente, foi positiva na reação. Dessa forma, detectou-se um total de quatro animais infectados por *Cryptosporidium* usando os diferentes tipos de PCR, totalizando 3,12 % das 121 aves amostradas (Figura 15).

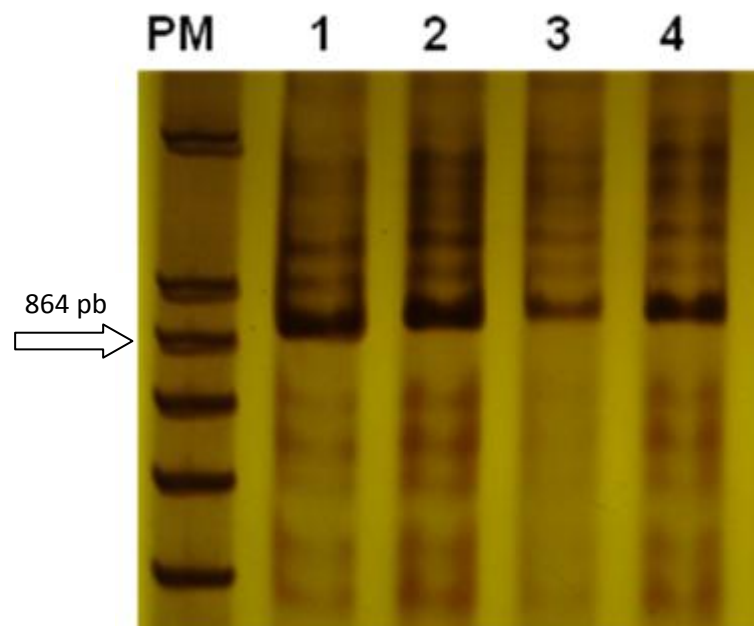


Figura 15. Gel de poliacrilamida mostrando fragmento contendo 826 a 864 pares de bases amplificado por PCR utilizando os iniciadores XIAOn F e R para o gene 18S rDNA de *Cryptosporidium* das amostras de fezes de aves. 1. Ararajuba (*Guaruba guarouba*), 2. Papagaio-da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*), 3. Papagaio-da-cara-roxa (*A. brasiliensis*), 4. Papagaio-de-peito-roxo (*A. vinacea*). PM – 100 pb.

## 5.2. DETECÇÃO DE *Cryptosporidium* EM ÁGUA DO PARQUE

### 5.2.1. Parâmetros físicos, químicos e biológicos das amostras de água

Na Tabela 4 são mostrados os dados obtidos na análise dos fatores físicos, químicos e biológicos da água coletada em seis coleções aquáticas do Zoológico Municipal de Curitiba. A maior parte das coleções de água investigadas neste trabalho apresenta qualidade satisfatória. Os dados relativos ao pH encontram-se dentro dos desejáveis, bem como os de oxigênio dissolvido. A coleção aquática correspondente ao recinto dos cervos-nobre (amostras 1, 2 e 3) apresentou cor e turbidez acima dos valores registrados nas demais coleções aquáticas estudadas.

Nas amostras 7, 8 e 18 foi registrada a presença de *Microcystis* (gênero de cianobactéria). Na amostra 7, além deste gênero foi registrada a presença de *Pseudoanabaena*, outro gênero de cianobactéria. Nas amostras 4 e 6 observou-se a presença de *Lemna* (macrófita) que é utilizada como biorremediadora e bioindicadora de efluentes da qualidade da água.

Tabela 4. Parâmetros físicos, químicos e biológicos analisados nas coleções aquáticas amostradas do Zoológico Municipal de Curitiba.

	Amostra	Temperatura do ar (°C)	Temperatura da água (°C)	pH	Oxigênio dissolvido	Cor (UH)	Turbidez (NTU)	Organismos*
Cervos-nobre	1	23,0	17,2	6,57	8,64	400	191	
	2	23,0	16,5	6,88	8,02	300	197	
	3	23,0	16,0	6,92	7,89	200	143	
Lontras	4	21,0	15,6	7,02	15,68	25	2,03	<i>Lemna</i> sp.
	5	21,0	15,2	7,23	15,73	25	3,9	
	6	21,0	15,5	7,42	14,98	25	3,73	<i>Lemna</i> sp.
Aves aquáticas	7	22,0	15,8	7,56	13,87	100	20,1	<i>Microcystis</i> sp. e <i>Pseudoanabaena</i> sp.
	8	22,0	16,0	7,66	13,72	50	23,8	<i>Microcystis</i> sp.
	9	22,0	15,6	7,50	13,09	100	20,1	
Lagoa do Sapatão	10	18,0	14,9	7,05	12,45	50	4,05	
	11	18,0	14,2	7,02	11,99	50	2,65	
	12	18,0	14,5	7,13	12,36	25	2,9	
Macacos-aranha	13	19,0	15,1	7,54	11,66	100	9,4	
	14	19,0	15,4	7,82	10,97	75	7,7	
	15	19,0	14,8	7,65	11,03	100	9,27	
Macacos-prego	16	16,0	13,6	6,93	11,36	125	45,5	
	17	16,0	13,4	6,98	12,02	100	53,5	
	18	16,0	12,6	6,52	11,55	150	70,9	<i>Microcystis</i> sp.

Legenda: \*Identificação por microscopia óptica realizada na USAV-SANEPAR.

### 5.2.2. Detecção de *Cryptosporidium* pela coloração de Ziehl-Neelsen modificada e PCR

Nenhuma das amostras das coleções aquáticas foi positiva para *Cryptosporidium* pela coloração de Ziehl-Neelsen modificada.

Pela técnica de PCR somente a amostra 4, correspondendo a Lagoa do Sapatão amplificou um produto específico do fragmento de DNA de *Cryptosporidium* em duas das três amostras coletadas, tanto pela PCR1 como PCR2. Para a N-PCR as amostras foram negativas.

As duas amostras de água ultrapura contaminadas com oocistos de *Cryptosporidium* nas concentrações de  $10^4$  e  $10^3$  oocistos amplificaram um produto específico pela PCR1 e não amplificaram pela N-PCR. Na PCR2 a amostra contaminada com  $10^4$  oocistos apresentou amplificação fraca e na amostra com  $10^3$  houve maior número de produtos amplificados. A capacidade de recuperação de oocistos foi de 5 oocistos/mL e 0,5 oocisto/mL, respectivamente (Figura 16).

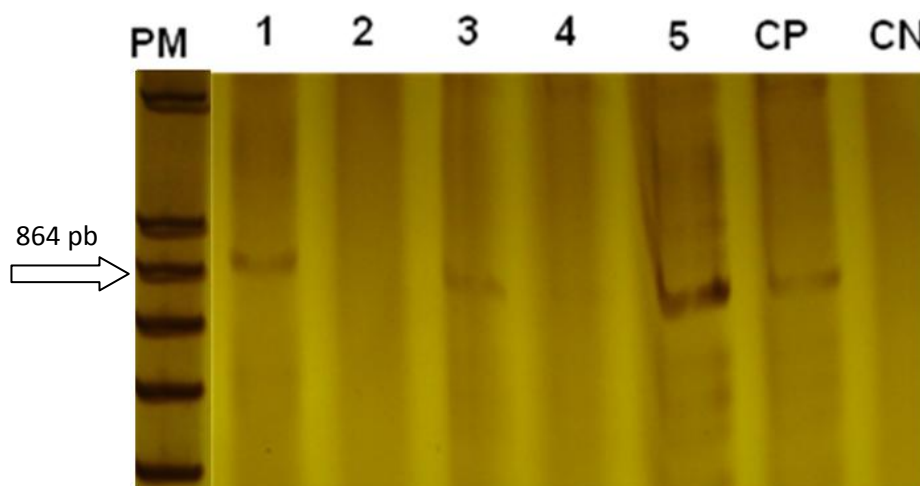


Figura 16. Gel de poliacrilamida mostrando o produto amplificado pela PCR das amostras de água utilizando os iniciadores XIAOn R e F para o gene 18S rDNA de *Cryptosporidium*, nos quais obteve-se amplicons de 826 a 864 pb. 1, 2 e 3. Lagoa do Sapatão, 4. Água ultrapura contaminada com  $10^4$  oocistos. 5. Amostra de água ultrapura contaminada com  $10^3$  oocistos. PM – 100 pb. CP (Controle Positivo), CN (Controle Negativo).



### 5.3. Análise do genótipo pelo sequenciamento do gene 18S rDNA

Em nosso estudo seis amostras foram positivas para *Cryptosporidium*: quatro amostras fecais provenientes de aves da família Psittacidae e duas amostras de água provenientes do mesmo ponto de coleta: a Lagoa do Sapatão.

Foi possível sequenciar as quatro amostras fecais e apenas uma das amostras de água, também foi sequenciada a amostra do controle positivo utilizada nos experimentos.

Das cinco sequências isoladas e analisadas, quatro delas (Cryp.2, Cryp.3, Cryp.4 e Cryp.5), provenientes de fezes das aves, apresentaram identidade genotípica compatível com *Cryptosporidium galli* e com similaridade de 99 % (nº GenBank EU543268.1). O isolado Cryp. 1 proveniente de amostras de água e o controle positivo apresentaram identidade genotípica compatível com *Cryptosporidium parvum* e similaridade de 99 % (nº GenBank AF093490.1) (Figura 17).

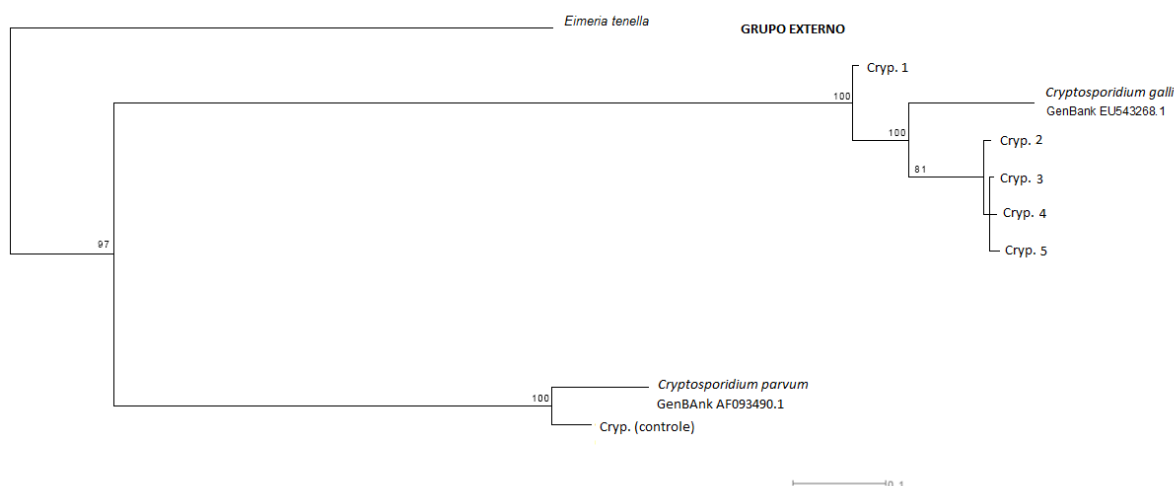


Figura 17. Relação evolutiva dos isolados de *Cryptosporidium* sp. das sequências do gene 18SSU rDNA, provenientes de fezes de aves e água dos recintos do Zoológico Municipal de Curitiba. Em água: Cryp1. Em aves por: Cryp. 2, Cryp. 3, Cryp. 4 e Cryp. 5. Controle Positivo Cryp. *C. parvum* (GenBank nº AF093490.1). *C. galli* (GenBank nº EU543268.1). Grupo externo – *Eimeria tenella*

A construção filogenética por meio de análise Bayesiana mostrou a formação de dois grupos. O controle positivo (cepa referência de *C. parvum*) agrupou com a sequência de *C. parvum* disponível no GenBank, com um suporte de ramo de 100 %. Já os isolados encontrados neste trabalho, formaram um único grupo. O isolado proveniente de água e identificado como *C. parvum* ficou próximo de *C. galli* sequência do Genbank. Todos os isolados provenientes de aves ficaram em um mesmo grupo com suporte de ramo de 81 % (Figura 17).

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas amostras fecais de 121 mamíferos do Zoológico Municipal de Curitiba e todas foram negativas para *Cryptosporidium*. Na literatura alguns trabalhos tratam de estudos sobre a prevalência e dinâmica da criptosporidiose em animais selvagens, tanto de vida livre quanto em cativeiro. Ravaszova *et al.* (2012) na Eslováquia, Castro-Hermida *et al.* (2011) na Galícia (Espanha), Van *et al.* (2010) no Gabão, Sak *et al.* (2013) na República Central da África e Kowalewski *et al.* (2011) na Argentina, encontraram prevalências de *Cryptosporidium* que variaram de 0 a 55,6 % em diversas espécies de mamíferos. Sak *et al.* (2013) alertam que a maioria dos trabalhos realizados não contemplam a identificação da espécie, fato que compromete o desenvolvimento de estudos que envolvam a cadeia de transmissão deste protozoário.

Hill *et al.* (2008) realizaram a caracterização genética de isolados de *Cryptosporidium* provenientes do cusu-de-orelhas-grandes (*Trichosurus vulpecula*), um marsupial australiano com hábitos sinantrópicos. Dois genótipos foram encontrados, formando dois clados na árvore filogenética, por meio da análise de Neighbor-Joining. O isolado dominante apresentou maior similaridade com o genótipo I de *Cryptosporidium* de gambá da América do Norte (*Didelphis virginiana*) e *C. macropodum*, presente em canguru-cinzento (*Macropus giganteus*). O segundo grupo de isolados foi mais similar a *C. hominis* e *C. parvum*, os autores comentam o risco de transmissão zoonótica devido à sinantropia presente nesta espécie de marsupial.

Quanto às aves, no nosso estudo, quatro psitacídeos em 79 examinados foram positivos para *Cryptosporidium galli*: um exemplar de *Guaruba guarouba* (ararajuba), dois exemplares de *Amazona brasiliensis* (papagaio-de-cara-roxa) e um exemplar de *Amazona vinacea* (papagaio-de-peito-roxo). Não foram encontradas publicações citando infecção por qualquer espécie de *Cryptosporidium* nestes animais. Estes resultados podem ser considerados como primeiro registro para infecção por este protozoário nestas espécies, as quais são nativas do Brasil, com destaque para o papagaio de-cara-roxa considerado espécie endêmica da Mata Atlântica do litoral sul de São Paulo e norte do Paraná. Todas se encontram ameaçadas de extinção.

Papini *et al.* (2012) analisaram a presença de endoparasitos em aves do Zoológico de Giardini (Itália) e de lojas de aves. Técnicas moleculares foram realizadas, o sequenciamento das quatro amostras positivas foi realizado, mas sem sucesso nos resultados obtidos. Os autores relataram a presença de *Cryptosporidium* em *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro), *Platycercus eximius* (roselha-do-leste) e *Psittacula eupatria* (periquito-alexandrino), todos pertencentes ao grupo dos psitacídeos.

Em grande parte dos trabalhos que envolvem a prevalência e dinâmica de transmissão de enteroparasitos em animais de zoológicos, em especial a criptosporidiose, os autores empregam como técnica para detecção de *Cryptosporidium* a coloração de *Ziehl-Neelsen* (GOMEZ *et al.*, 1992; GOMEZ *et al.*, 1996; GOMEZ *et al.*, 2000; GRACENEA *et al.*, 2002; VENTURINI *et al.*, 2006; PÉREZ CORDÓN *et al.*, 2008; FAGIOLINI *et al.*, 2010). Alguns destes trabalhos são recentes, fato que pode causar preocupação, pois o diagnóstico baseado somente nesta técnica não possibilita a identificação da espécie de *Cryptosporidium* envolvida na infecção. Há necessidade de realizar técnicas complementares, como as moleculares, que permitem identificação das espécies presentes, bem como de novos genótipos. Estudos moleculares auxiliam no entendimento da dinâmica de transmissão de *Cryptosporidium* e permitem verificar a presença de espécies de potencial zoonótico (RYAN *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2005; MATSUBAYASHI *et al.*, 2005; ROHELA *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2008; GEURDEN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011).

*Cryptosporidium* tem sido registrado em mais de 30 diferentes espécies de aves no mundo distribuídas nas ordens: Anseriformes, Charadriiformes, Columbiformes, Galliformes, Passeriformes, Psittaciformes e Struthiniformes (GOMES, *et al.*, 2012).

Em aves a criptosporidiose se apresenta de três principais formas: respiratória, intestinal e renal, com manifestações clínicas ou sub clínicas (SANTIN, 2013). Nenhum dos animais positivos para *Cryptosporidium galli* no presente estudo (aves da família Psittacidae) apresentava sinais clínicos, fato que pode corroborar com os achados de Ng *et al.* (2006) e Wang *et al.* (2011). Ng *et al.* (2006) pesquisaram a presença de *Cryptosporidium* na Austrália, tendo sido identificadas 4 espécies: *C. galli*, *C. baileyi*, *C. andersoni* e *C. muris* em aves das ordens:

Psittaciformes, Passeriformes e Galliformes. Os autores sugerem que as aves podem ter um importante papel na epidemiologia de *Cryptosporidium* e que é necessário conhecer as adaptações entre parasitos e hospedeiros para compreender as implicações possíveis em saúde pública. A espécie identificada neste estudo (*C. galli*) não tem sido apontada como importante elemento de transmissão zoonótica no mundo.

No presente estudo, animais da ordem Anseriformes (patos, marrecos, gansos, tadornas) não foram amostrados, pelo fato de grande parte deles serem animais migratórios e não pertencerem ao plantel de animais do Zoológico Municipal de Curitiba e também devido a estes animais estarem alojados em um grande recinto denominado “santuário das aves” fato que dificultou o processo de coleta de fezes, bem como a identificação dos animais.

Kuhn *et al.* (2002) analisaram 69 amostras de fezes provenientes de patos (*Anas spp.*) da região de Las Cruces (Novo México). Destas amostras, 49 % foram positivas para *Cryptosporidium*, a técnica utilizada foi a de centrífugo-flutuação em Sulfato de zinco, seguida de coloração de Ziehl-Neelsen modificada, os autores ressaltaram a importância destes animais na contaminação de coleções de água devido ao hábito migratório que possuem. Kassa *et al.* (2004) comentaram sobre o aumento das populações de gansos-canadenses (*Branta canadensis*) e sobre a possibilidade de contaminação fecal do ambiente em três condados de Ohio (Lucas, Ottawa e Wood). O método de Ensaio Imunoenzimático Indireto em fase sólida (EIA) foi utilizado, 90 % dos locais amostrados (amostras de água) foram positivos, mas não foram determinados espécies/genótipos. Amer *et al.* (2010) relataram o primeiro registro de *C. baileyi* em pato-ferrugíneo (*Tadorna ferruginea*), na China. Portanto, estudos que visem descrever o papel dos animais migratórios presentes em zoológicos são relevantes.

Rohela *et al.* (2005) e Quah *et al.* (2011) verificaram a ocorrência de *Cryptosporidium* nas aves no Zoológico Nacional de Kuala Lumpur. A técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada foi utilizada seguida de confirmação por imunofluorescência. As aves que albergavam *Cryptosporidium* foram: calao (*Aceros corrugatus*), faisão-grande (*Argusianus argus*), cisne-negro (*Cygnus atratus*), ganso-africano (*Anser cygnoides*), Marabu (*Leptoptilos crumeniferus*) e arara-branca (*Cacatua moluccensis*) esta última espécie de ave era normalmente utilizada em um

show com os visitantes. Foi detectada a espécie *C. parvum*, a qual não tem sido comumente encontrada em aves. Os autores concluíram que zoológicos e parques de aves são importantes fontes de infecção por *Cryptosporidium* para os seres humanos e outros animais que podem atuar como transportadores mecânicos de oocistos.

Shulze *et al.* (2012) verificaram a infecção da Bursa de Fabricius por *Cryptosporidium baileyi* em aves da família Anatidae (*Mergus serrator* – merganso-de-poupa) em um Zoológico da Alemanha. Os animais morreram magros e os autores acreditam que a fonte de introdução dos protozoários foram patos adultos trazidos para chocar os ovos destes animais. Desta forma, a quarentena dos animais a serem introduzidos, com exames para diagnosticar a presença de *Cryptosporidium* é bastante válida, segundo os autores.

Wang *et al.* (2012) detectaram infecção por *Cryptosporidium* em codornas, na Província de Heran (China) sendo identificadas as espécies *C. baileyi* e *C. meleagridis*.

Morgan *et al.* (2000) realizaram a caracterização morfológica e genética de *Cryptosporidium* de Periquitos-de-colar (*Psittacula krameri*) e a espécie identificada foi *Cryptosporidium meleagridis*. Os autores ressaltaram que este foi o primeiro registro de *C. meleagridis* em um hospedeiro não galiforme.

Abe & Isiki (2004) comentaram que alguns estudos indicam a presença de novas espécies/genótipos de *Cryptosporidium* em aves e confirmam a necessidade de identificar, com precisão, os parasitos para a compreensão da epizootia desta infecção em aves e para o controle da criptosporidiose humana. Neste estudo, *Cryptosporidium* isolados de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), foram sequenciados e identificados como *C. meleagridis* e *C. baileyi*. Este estudo documenta o primeiro registro destas espécies em calopsita e sugere que aves de estimação podem desempenhar um papel importante na epidemiologia da criptosporidiose.

Qi *et al.* (2011) pesquisaram *Cryptosporidium* em aves comercializadas em aviários na China. A prevalência foi de 8,1 %. Três espécies (*C. baileyi*, *C. meleagridis* e *C. galli*) e dois genótipos (*Cryptosporidium* genótipo III aviário e *Cryptosporidium* genótipo IV aviário) foram identificados. Os seguintes grupos de aves foram positivos: Passeriformes, Columbiformes e Psittacidae, totalizando 12

espécies. Os autores sugerem que a presença de *C. meleagridis* em animais vendidos em lojas representa risco potencial de transmissão zoonótica. Os animais amostrados não apresentavam sinais clínicos de infecção, como também foi observado no nosso trabalho. No Brasil, Antunes *et al.* (2008) identificaram *C. galli* em canários, calopsitas e curiós. Este estudo é considerado o primeiro registro de *C. galli* em curiós (*Oryzoborus angolensis*).

Silva *et al.* (2009) estudaram o parasitismo gastrointestinal em 12 corujas (*Rhinoptynx clamator*, *Tyto alba*, *Athene cunicularia*, *Megascops* spp. e *Bubo virginianus*), mantidas em cativeiro na região Sul do Brasil. Oocistos de *Cryptosporidium*, *Eimeria* e *Isospora* foram identificados por meio da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen. As aves amostradas não apresentaram sinais clínicos. No nosso estudo, três espécies de corujas tiveram material fecal coletado: murucututu (*Pulsatrix perspicillata*), murucututu-de-barriga-amarela (*Pulsatrix koeniswaldiana*) e mocho-orelhudo (*Rhinoptynx clamator*) e em nenhuma delas foram encontrados oocistos de *Cryptosporidium*.

Nakamura *et al.* (2009) objetivaram determinar a prevalência de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* em aves mantidas em cativeiro no Brasil. Um total de 966 amostras (de 18 famílias de aves) foi coletado. 47 isolados foram sequenciados permitindo a identificação de *C. baileyi* em urubu-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*), em galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) e em canário-terra-verdadeiro (*Sicalis flaveola*); *C. galli* em canário (*Serinus canaria*), calopsita (*Nymphicus hollandicus*) e curió (*Oryzoborus angolensis*). *C. meleagridis* em galinha doméstica. *C. parvum* em calopsita. *Cryptosporidium* - genótipo I aviário - em canário e em um pavão-indiano (*Pavo cristatus*). *Cryptosporidium* - genótipo II aviário - em avestruz (*Struthio camelus*) e *Cryptosporidium* - genótipo III aviário - em calopsita e agapornis (*Agapornis roseicollis*).

No Zoológico Municipal de Curitiba não existem recintos expondo animais da ordem Passeriformes, portanto, este grupo não foi amostrado. Porém, como o Zoológico encontra-se em uma ampla área de Floresta com Araucária, há grande quantidade destes animais livres, representados por várias espécies que realizam seu ciclo de vida neste local e que potencialmente podem servir como transmissores do parasito *Cryptosporidium*.

Silva *et al.* (2010) comentaram a escassez de informações relacionadas com a epidemiologia da infecção por *Cryptosporidium* em aves da ordem Passeriformes. A espécie *C. galli* foi identificada, no estudo destes autores e todos os aviários foram positivos para a mesma e, apesar disso, morbidade e/ou mortalidade foram observadas em apenas um aviário e associadas à infecção concomitante com *Escherichia coli* e *Isospora* sp.

Sevá *et al.* (2011) realizaram um estudo no Brasil com aves silvestres. *C. galli* foi encontrado em sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*), trinca-ferro (*Saltator similis*), cigarrinha-do-norte (*Sporophila schistacea*), pintassilgo-comum (*Carduelis carduelis*), canário-da-terra-verdadeiro (*Sicalis flaveola*). *C. baileyi* foi detectado nas seguintes espécies: pintassilgo-comum, pixoxó (*Sporophila frontalis*), cardeal-do-nordeste (*Paroaria dominicana*) e canário-da-terra-verdadeiro (*Sicalis flaveola*). O genótipo II aviário de *Cryptosporidium* foi encontrado em periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma*). Os autores sugerem mais estudos contemplando aves em estado silvestre.

Também no Brasil, Gomes *et al.* (2012) investigaram a presença de *Cryptosporidium* em aves exóticas, comercializadas em lojas de pequenos animais no estado do Rio de Janeiro. Do total de 103 amostras analisadas, 7 (6,8 %) delas foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium*. A análise dos isolados revelou as seguintes espécies/genótipos: *Cryptosporidium parvum* em *Lonchura striata domestica* - um passeriforme originário da China, denominado manon; Genótipo aviário III em Pada (*Padda oryzivora*) pássaro da Indonésia, e em calopsita, psitacídeo originário da Austrália. Os autores não conseguiram identificar a espécie de *Cryptosporidium* proveniente de canários (*Serinus canarius*), mas comentaram que os oocistos encontrados apresentaram grande similaridade com *C. parvum*.

Grande parte dos estudos sobre criptosporidiose em aves são realizados em aves de corte como galinhas e perus. Kimura *et al.* (2004) analisaram isolados de *Cryptosporidium* oriundos de galinhas no Japão e identificaram *C. baileyi* após sequenciamento e análises filogenéticas. Wang *et al.* (2010) analisaram 2579 amostras fecais de galinhas poedeiras, frangos de corte e patos de Pequim oriundos de 46 granjas na Província de Henan (China). Duas espécies de *Cryptosporidium* foram identificadas: *C. baileyi* (em 184 amostras) e *C. meleagridis* (em 3 amostras). Os autores chamam a atenção para o contato próximo entre humanos e galinhas na



produção destes animais em granjas, destacando que *C. meleagridis* é a terceira espécie mais comum em humanos e que potencialmente pode se tornar agente de uma doença emergente em algumas localidades da China. Baroudi *et al.* (2013) na Argélia identificaram *C. meleagridis* em 34 % das galinhas e em 44 % dos perus. Os autores reforçam a importância desta espécie de *Cryptosporidium* em cadeias de transmissão zoonótica.

Alguns trabalhos tratando sobre a criptosporidiose são realizados com avestruzes, animais estes que se encontram em transição entre o status silvestre e de animal de criação, porém, a maioria dos trabalhos realizados, são desenvolvidos com animais criados em fazendas com a finalidade de agronegócios, fato que desperta o interesse para o diagnóstico de doenças. Meireles *et al.* (2006) comentam sobre a existência de diversos trabalhos sobre criptosporidiose em avestruzes no mundo sem contemplar a caracterização molecular e que os isolados obtidos provavelmente pertençam a uma nova espécie, sendo necessários mais estudos para tal confirmação. Oliveira *et al.* (2008) determinaram a prevalência de *Cryptosporidium* em avestruzes criados no estado do Rio de Janeiro, por meio da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada, sendo 44,4 % das amostras positivas. Wang *et al.* (2011) pesquisaram o parasito em avestruzes, criados em fazendas na China, sendo identificada a espécie *C. baileyi*. Os autores ressaltam que estudos de transmissão cruzada demonstraram que isolados de *C. baileyi* podem infectar galinhas e codornas. Nguyen *et al.* (2013) analisaram avestruzes de uma fazenda no Vietnã, utilizaram a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen modificada e verificaram a positividade para oocistos de *Cryptosporidium* em 110 amostras (23,7 %), por meio de análises moleculares foi identificada infecção por *Cryptosporidium* genótipo II aviário. No nosso trabalho, as fezes dos avestruzes amostrados foram negativas para *Cryptosporidium*.

No Brasil, não há trabalhos que tratem da ocorrência de *Cryptosporidium*, em animais mantidos em cativeiro em ambientes de zoológicos ou de triagem de animais silvestres. Portanto, o presente estudo realizado em Curitiba - Pr, tem potencial para dar contribuições para o tema criptosporidiose e poderá instigar pesquisas como esta em outros zoológicos e centros de triagem de animais selvagens no país proporcionando maior eficiência nos trabalhos de manejo de animais nestes ambientes.

Em nosso estudo verificou-se a maior sensibilidade das técnicas moleculares sobre a de coloração utilizada (ZN modificada). O protocolo de técnicas moleculares, normalmente utilizado para a detecção de *Cryptosporidium* é constituído da realização de PCR seguida de N-PCR. No presente estudo, este protocolo padrão não apresentou reprodutibilidade dos resultados e optou-se por realizar PCR de primeira etapa com os iniciadores da N-PCR. Os resultados foram melhores e reprodutíveis para todas as amostras analisadas, inclusive foi possível detectar a positividade de mais uma amostra de material fecal, por meio deste protocolo.

Neste estudo, nenhuma das amostras de mamíferos foi positiva para oocistos de *Cryptosporidium*. Este resultado pode estar relacionado com: a arquitetura dos recintos, a qualidade dos alimentos e da água ofertados e também ao cuidado diário de higienização realizado. Além disto, estes animais estão inseridos em recintos amplos, com ausência de animais sinantrópicos e número reduzido de animais por recinto. Assim, tais condições podem ajudar a explicar o resultado negativo para *Cryptosporidium* nas amostras fecais coletadas.

Com relação às aves amostradas, foram encontradas amostras fecais positivas para *Cryptosporidium galli* em quatro aves da mesma família (Psittacidae): ararajuba (*Guaruba guarouba*), papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) e papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) que estão alojadas no Setor Extra do Zoológico Municipal de Curitiba. Uma explicação para a presença de *C. galli* nestas aves pode estar associada à arquitetura dos recintos destes animais, os quais são menores, mais próximos uns dos outros e com a maior densidade populacional e ainda, há uma grande quantidade de passeriformes que entram nestes recintos em busca de alimento (principalmente) e água, podendo assim contaminá-los. Outra explicação seria que as ararajubas presentes neste local, foram trazidas do Passeio Público, parque da área central da cidade de Curitiba, em que há invasão de pombas européias (*Columba livia*) que poderiam servir como disseminadoras de oocistos caso já estivessem previamente, infectadas. Devido à proximidade dos recintos dos papagaios-de-peito-roxo e papagaios-de-cara-roxa a infecção para estes possa ter ocorrido.

É importante ressaltar que *C. galli* não foi registrado em humanos, portanto, trata-se de uma espécie que até o momento parece não ter potencial zoonótico.

Neste trabalho também foi pesquisada a presença de *Cryptosporidium* em seis coleções aquáticas do Zoológico Municipal de Curitiba. Uma delas mostrou positividade para *Cryptosporidium parvum*. A coleção aquática positiva corresponde a Lagoa do Sapatão, um espaço que recebe toda a água proveniente dos recintos dos animais e localiza-se em uma região mais baixa do Zoológico Municipal de Curitiba a qual possui um canal cuja água escoar diretamente no Rio Iguaçu. Podendo assim, ser fonte de poluição biológica para a água deste rio. Não foi possível identificar a origem da contaminação para esta coleção aquática, porém, outros animais presentes no Zoológico podem ser portadores de oocistos desta espécie de *Cryptosporidium*, resultando nesta contaminação.

Apesar do potencial de contaminação do Rio Iguaçu por escoamento da água proveniente do Zoológico, um trabalho de Osaki *et al.* (2013), empregando PCR e nested-PCR para detectar *Cryptosporidium* em água de captação na região metropolitana de Curitiba, não indicou a presença do protozoário em amostras de água do Rio Iguaçu. Outra coleta foi realizada em outro período (dezembro de 2008 a janeiro de 2009) e próximo ao ponto de captação de água para tratamento pela companhia de saneamento do estado (SANEPAR). É possível que fatores como sazonalidade e o ponto de captação (próximo ou distante à fonte de contaminação) influenciem a detecção de *Cryptosporidium* em amostras de água.

Vários são os estudos que tratam da presença de *Cryptosporidium* em água os quais focam diversos aspectos deste tipo de contaminação parasitária, alguns deles são: pesquisas por métodos mais eficazes para detecção de *Cryptosporidium* em amostras ambientais (KOOMPAPONG & SUKTHANA, 2012; RUECKER *et al.*, 2012; KOTHOVADE, 2012; LEE *et al.*, 2013; OZAKI *et al.*, 2013; FRANCY *et al.*, 2013; NORMAN *et al.*, 2013;), descrição de surtos, principalmente em centros urbanos (BROWN *et al.*, 1989; NEWMAN *et al.*, 1993; GOLDSTEIN *et al.*, 1996; BALDURSSON & KARANIS, 2011; XIAO *et al.*, 2012; MOON *et al.*, 2013; HOPKINS *et al.*, 2013), detecção em água de beber e de recreação (FRANCO *et al.*, 2001; SIMMONS *et al.*, 2001; HOFSTRA *et al.*, 2013; GALVÁN *et al.*, 2014) e alguns sobre contaminação fecal do solo e da água por animais de criação (THURMAN *et al.*, 1998; HOAR *et al.*, 1999; BRASSEUR *et al.*, 2011; VAN DYKE *et al.*, 2012; KANG'ETHE *et al.*, 2012; NORMAN *et al.*, 2013). Não há registros de estudos sobre contaminação de coleções de água por *Cryptosporidium* em Zoológicos do mundo,

de modo que a detecção desse parasito em coleção aquática do Zoológico Municipal de Curitiba constitui a primeira descrição dessa ocorrência.

No presente estudo, três amostras de água foram positivas para cianobactérias, duas correspondentes ao santuário das aves e uma correspondente ao recinto dos macacos-prego. Tal registro traz preocupação, pois os animais possuem contato direto com essa água. A identificação de cianobactérias é importante, porque tanto *Microcystis* quanto *Pseudoanabaena* são produtoras de cianotoxinas de ação neurotóxica e hepatotóxica. Essas cianobactérias apresentam capacidade de crescimento nos mais diferentes meios, sendo os de água doce mais favoráveis, principalmente aqueles com água neutroalcalina (pH 6-9), temperatura entre 15 e 30 °C e alta concentração de nutrientes (nitrogênio e fósforo), características que foram observadas nas coleções aquáticas amostradas. De acordo com Sant'Anna & Azevedo (2000) já foi registrada a ocorrência de pelo menos 20 espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, no mundo, incluídas em 14 gêneros. De acordo com os mesmo autores, a espécie *Microcystis aeruginosa* apresenta a distribuição mais ampla no Brasil. Algumas dessas toxinas são caracterizadas por sua ação rápida causando a morte de mamíferos por parada respiratória após minutos de exposição.

Em duas amostras correspondentes ao recinto das lontras houve o registro da macrófita *Lemna* sp. utilizada como bioindicadora e biorremediadora de efluentes (CARIS *et al.*, 2008). Sua presença corrobora a qualidade da água desse recinto, proveniente de uma nascente próxima ao mesmo, salienta-se que este espaço é o único que não recebe a água proveniente do Rio Iguaçu.

No presente estudo a análise filogenética por inferência Bayesiana dos isolados sequenciados mostrou a formação de dois clados (um relacionado aos isolados encontrados neste estudo e outro relacionado ao controle positivo de referência utilizado). Os isolados provenientes das aves mostraram bom suporte de ramo, sendo identificados como *C. galli*. Já o isolado proveniente de uma amostra de água e identificado como *C. parvum* pareceu ao clado formado por *C. galli* e não à sequência de *C. parvum* depositada no GenBank e o controle positivo também identificado como *C. parvum*. A aparente incongruência pode ser explicada pela acurácia da análise Bayesiana, pois o controle positivo isolado de gado bovino proveniente de outro estado (MG) apresenta menor similaridade ao *C. parvum*

isolado neste estudo, apesar de serem da mesma espécie. O mesmo mostrou-se mais próximo de *C. galli* isolado das amostras fecais de aves, fato que pode indicar a presença de processos evolutivos ocorrendo no mesmo biótopo.

Os trabalhos sobre criptosporidiose que tratam sobre o encontro deste parasito em um novo hospedeiro (relatos de caso) abordam principalmente, aspectos da prevelência em animais de interesse econômico. Poucos são os estudos que abordam questões evolutivas dos isolados sequenciados e seus respectivos hospedeiros. Estes trabalhos apresentam como principal análise filogenética utilizada a de Neighbor-Joining (XIAO *et al.*, 1999; SULAIMAN *et al.*, 2000; HILL *et al.*, 2008; SEVÁ *et al.*, 2011).

Atualmente, existe uma maior tendência à utilização de análises filogenéticas por inferência Bayesiana (aleatoriedade) em isolados sequenciados, principalmente por respeitar os Princípios da Verossimilhança, porém, ainda são poucos os trabalhos realizados neste sentido. Pode-se citar o trabalho de Abeywardena *et al.* (2012) no qual os autores realizaram uma investigação epidemiológica molecular para os gêneros *Cryptosporidium* e *Giardia* em gado doméstico. As análises por inferência Bayesiana são mais popularizadas em estudos que destacam outros aspectos como: análise da relação entre patógenos e variáveis físico-químicas (STALEY *et al.*, 2012), respostas de IgG e soroconversão para *Cryptosporidium* (SARKAR *et al.*, 2012), sensibilidade e especificidade de métodos diagnósticos (GEURDEN *et al.*, 2008; DE WAELE *et al.*, 2011), dinâmica temporal e espacial da infecção por *Cryptosporidium parvum* em animais de fazendas leiteiras e risco para Bacias Hidrográficas (SZONYI *et al.*, 2010), variações sazonais (SZONYI *et al.*, 2010, GONZALEZ-MORENO *et al.*, 2013) e avaliação de tratamentos para desinfecção de água (SIVAGANESAN *et al.*, 2003; QIAN *et al.*, 2005; SIVAGANESAN & SIVAGANESAN, 2005; SIVAGANESAN & MARIÑAS, 2005; DONOFRIO *et al.*, 2013).

A análise filogenética mudou muito na última década, sequências de dados tornaram-se a fonte mais comum de informação, isto significa que os modelos explícitos de processos evolutivos têm sido desenvolvidos num contexto de probabilidade, que permitem dados mais realistas para as análises. A análise Bayesiana foi desenvolvida para a construção de árvores e está aumentando muito em popularidade. Isso pelo fato de ser uma boa estratégia heurística, permitindo que

grandes quantidades de dados sejam analisadas, com os modelos de evolução mais complexos (MORRISON, 2006).

Diante dos resultados obtidos, neste trabalho, torna-se evidente a necessidade de medidas que envolvam cuidados relacionados ao destino dos dejetos produzidos pelos animais pertencentes ao plantel do Zoológico Municipal de Curitiba, devido à positividade de algumas amostras de fezes e de água coletadas, para o parasito *Cryptosporidium*. Alguns estudos trazem uma abordagem mais ampla quando o assunto é criptosporidiose, fato que comprova a importância desta protozoonose em tempos de intenso aumento da população humana, de animais de criação, condições de saneamento básico deficiente e também as questões de planejamento e resiliência dos grandes centros urbanos para as questões de saúde pública (ROBINSON, *et al.*, 2011; HOFSTRA *et al.*, 2013; LAL *et al.*, 2013; SLAPETA, 2013). Torna-se importante ressaltar o grande público que visita o Zoológico Municipal de Curitiba (aproximadamente 650 mil pessoas/ano) e a possibilidade de vários indivíduos imunodeprimidos estarem presentes neste conjunto de pessoas, estando expostos ao risco de adquirir a infecção por *Cryptosporidium*, visto que foi identificada uma espécie deste gênero com potencial zoonótico, em uma das amostras de água.

## 7. CONCLUSÕES

- O presente estudo é o primeiro realizado em zoológicos do Brasil.
- Das 121 amostras fecais de aves e 128 amostras fecais de mamíferos, apenas quatro do primeiro grupo foram positivas para oocistos de *Cryptosporidium* no Zoológico Municipal de Curitiba, indicando baixa ocorrência do protozoário.
- Os resultados do presente trabalho confirmaram a maior sensibilidade da técnica de PCR sobre a coloração de Ziehl-Neelsen modificada, pois das 121 amostras de fezes de aves, foi possível detectar *Cryptosporidium* em quatro usando a primeira técnica (3,12 %) e duas usando a segunda técnica (1,65 %).
- A espécie de *Cryptosporidium* identificada, por sequenciamento, nas quatro amostras fecais de aves positivas na PCR, um espécime de *Guaruba guarouba* (ararajuba), dois espécimes de *Amazona brasiliensis* (papagaio-de-cara-roxa) e um espécime de papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) foi *Cryptosporidium galli*. Embora não seja uma espécie que afete o ser humano, o encontro da mesma em animais do Zoológico Municipal de Curitiba alerta para a necessidade de manejo criterioso e adequado para que não ocorram surtos de criptosporidiose entre os animais do plantel.
- O registro de *Cryptosporidium galli* para as aves *Guaruba guarouba* (ararajuba), *Amazona brasiliensis* (papagaio-de-cara-roxa) e papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) é o primeiro na literatura mundial.
- A detecção e identificação molecular de *Cryptosporidium parvum* na água da Lagoa do Sapatão, que recebe água de todos os recintos do Zoológico Municipal de Curitiba, serve como alerta para o risco de contaminação de mananciais de captação de água por dejetos de animais silvestres de cativeiro. Sendo uma espécie zoonótica, *C. parvum* pode vir a ser causa de infecções tanto nos animais do Zoológico quanto em humanos. Porém a fonte de contaminação para as águas não foi identificada. Talvez, possa ter origem na fauna migratória que visita o local. Fato que pode auxiliar em repensar a arquitetura dos recintos do Zoológico, para que animais que não pertençam ao plantel não tenham acesso livre aos recintos.
- A análise filogenética realizada mostrou a formação de um único clado, com as duas espécies de *Cryptosporidium* identificadas. A espécie *C. parvum* em amostras de água do presente trabalho apresentou maior similaridade com os isolados de *C. galli* encontrados, quando comparada com a amostra controle e a sequência do GenBank. Fatores evolutivos podem estar associados a este resultado.

## 8. PERSPECTIVAS E RECOMENDAÇÕES

Neste trabalho foram utilizadas técnicas para pesquisa de *Cryptosporidium* em amostras fecais de animais e água do Zoológico Municipal de Curitiba. Abordagens posteriores poderiam incluir a avaliação quantitativa deste e de outros parasitos, já que o número de formas parasitárias é um fator importante para determinar o risco de infecção, seja entre os animais ou por contaminação indireta de origem hídrica que possa afetar os humanos. Atualmente, técnicas que permitem análise quantitativa, como as mencionadas no método 1623 da USEPA (E.U.A.), são disponibilizadas comercialmente.

Nenhum dos animais positivos para *Cryptosporidium* apresentou sintomatologia específica para esta parasitose, o que pode dificultar o diagnóstico da infecção, já que no Zoológico Municipal de Curitiba, na maioria das vezes, os exames parasitológicos de fezes são realizados somente quando o animal apresenta algum sintoma. Os animais que apresentaram positividade neste estudo eram adultos e com bom estado de saúde aparente. A aplicação das técnicas descritas, no presente trabalho, em ocasiões em que fossem observados surtos de diarreia entre os animais poderia aumentar as chances de detecção de *Cryptosporidium*. No entanto, um plano de aplicação periódica da técnica por amostragem poderia evitar surtos que resultassem em perda de espécimes, especialmente de animais jovens ou debilitados, em que a sintomatologia da doença é mais evidente e mais grave.

O encontro de *Cryptosporidium* em algumas das amostras fecais de aves do Zoológico Municipal de Curitiba enfatiza a importância de realização de exames laboratoriais de fezes antes que os animais sejam introduzidos nos recintos. Especialmente quando originados do Passeio Público (parque situado no centro da cidade de Curitiba), onde há grande número de animais sinantrópicos. Animais recém-introduzidos no Zoológico podem servir como fonte de contaminação para as aves que lá são mantidas.

Sugere-se, portanto, a elaboração de um plano de coleta de fezes bastante criterioso dos animais do plantel do Zoológico Municipal de Curitiba, inserindo técnicas mais específicas para melhor diagnóstico principalmente no que se refere ao grupo dos protozoários e para que se possa manter a saúde dos animais. Atualmente, são realizados somente técnicas de flutuação em sacarose e de sedimentação, assim poderia ser adotada também a técnica de coloração específica



para *Cryptosporidium*. Considerando o custo relativamente alto do emprego da PCR para uso, em rotina de larga escala, essa técnica poderia ser usada em situações com suspeita de surtos, para uma rápida intervenção. Nos casos em que fosse detectada a presença do parasito, animais positivos para *Cryptosporidium* poderiam ser remanejados para recintos cujos dejetos não escoem para mananciais de captação a fim de minimizar a contaminação de corpos d'água como o Rio Iguaçu.

## REFERÊNCIAS

- ABE, N.; ISEKI, M. Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 92, n. 10, p. 523-526, 2004.
- ABEYWARDENA, H.; JEX, A. R.; NOLAN, M. J.; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; MCANULTY, R. W.; GASSER, R. B. Genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* from dairy calves: discovery of species/genotypes consistent with those found in humans. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 12, n. 8, p. 1984-1993, 2012.
- ABEYWARDENA, H.; JEX, A. R.; HIMMELSTJERNA, G. V.; HAYDON, S. R.; STEVENS, M. A.; GASSER, R. B. First molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from *Bubalus bubalis* (water buffalo) in Victoria, Australia. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, p. 96-102, 2013.
- ABRAHAMSEN, M. S.; TEMPLENTON, T. J.; ENEMOTO, S.; ABRAHANTE, J. E.; ZHU, G.; LANCTO, C. A.; DENG, M.; LIU, C.; WIDMER, G.; TZIPORI, S.; BUCK, G. A.; XU, P.; BANKIER, A. T.; DEAR, P. H.; KONFORTOV, B. A.; SPRIGGS, H. F.; IYER, L.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L.; KAPUR, V. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, New York, v. 302, p. 441-445, 2004.
- ABU SAMRA, S.; JORI, F.; SAMIE, A.; THOMPSON, P. N. The prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in wild mammals in the Kruger National Park, South Africa. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, p. 155-159, 2011.
- ABU SAMRA, N.; JORI, F.; XIAO, L.; RIKHOTSO, O.; THOMPSON, P. N. Molecular characterization of *Cryptosporidium* species at the wildlife/livestock interface of the Kruger National Park, South Africa. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Califórnia, v. 36, n. 3, p. 295-302, 2013.
- ABUBAKAR, I.; ALIYU, S. H.; ARUMUGAM, C.; USMAN, N. K.; HUNTER, P. R. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v. 63, p. 387-393, 2007.
- ADL, S. M.; LEANDER, B. S.; SIMPSON, A. G. B.; ARCHIBALD, J. M.; ANDERSON, O. R.; BASS, D.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FARMER, M. A.; KARPOV, S.; KOLISKO, M.; LANE, C. E.; LODGE, D. J.; MANN, D. G.; MEISTERFELD, R.; MENDONZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. **Systematic Biology**, Oxford, v. 56, p. 684-689, 2007.
- ALVES, M.; XIAO, L.; LEMOS, V.; ZHOU, L.; CAMA, V.; DA CUNHA, M. B.; MATOS, O.; ANTUNES, F. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. In mammals and reptiles at the Lisboa Zoo. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 97, p. 108-112, 2005.

AMER, S.; WANG, C.; HE, H. First detection of *Cryptosporidium baileyi* in Ruddy Shelduck (*Tadorna ferruginea*) in China. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tsukuba, v. 72, n.7, p. 935-938, 2010.

ANTUNES, R. G.; SIMÕES, D. C.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. Natural infection with *Cryptosporidium galli* in canaries (*Serinus canaria*), in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), and in lesser seed-finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. **Avian Diseases**, Lawrence Kansas, v. 52, n. 4, p. 702-705, 2008.

ARAÚJO, A. J.; KANAMURA, H. Y.; ALMEIDA, M. E.; GOMES, A. H.; PINTO, T. H.; DA SILVA, A. J. Genotypic identification of *Cryptosporidium* spp. isolated from HIV-infected patients and immunocompetent children of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 139-143, 2008.

APPELBEE, A. J.; THOMPSON R. C.; OLSON, M. E. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. **Trends Parasitology**, Cambridge, v. 21, n. 8, p. 370-376, 2005.

ARGENZIO, R. A.; LEECE, J. G.; POWELL, D. W. Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis. **Gastroenterology**, Quebec, v. 104, p. 440-447, 1993.

BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks-an update 2004-2010. **Water Research**, Lyngby, v. 45, n. 20, p. 6603-6614, 2011.

BAROUDI, D.; KHELEF, D.; GOUCEM, R.; ADJOU, K. T.; ADAMU, H.; ZHANG, H.; XIAO, L. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 196, n. 3-4, p. 334-340, 2013.

BIRD, R. G.; SMITH M. D. Cryptosporidiosis enteritis in man: parasite life cycle and fine structural pathology. **The Journal of Pathology**, New Jersey, v. 132, p. 217-233, 1980.

BLACKMAN, M. J.; BANNISTER, L. H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 117, p. 11-25, 2001.

BORGES, J. C. G.; ALVES, L. C.; VERGARA-PARENTE, J. E.; FAUSTINO, M. A. G.; MACHADO, E. C. L. Ocorrência de infecção por *Cryptosporidium* spp. em peixe-boi marinho (*Trichechus manatus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 60-61, 2009.

BRASSEUR, P.; AGNAMEY, P.; EMMANUEL, E.; PAPE, J. W.; VAILLANT, M.; RACCURT, C. P. *Cryptosporidium* contamination of surface and water supplies in Haiti. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Springer London, v. 66, n. 1, p. 12-17, 2011.

BRIGGS, A. D.; BOXAL, N. S.; VAN SANTEN, D.; CHALMERS, R. M.; McCARTHY, N. D. Approaches to the detection of very small, common, and easily missed outbreaks that together contribute substantially to human *Cryptosporidium* infection. **Epidemiology Infectology**, Cambridge, v. 2, p. 1-8, 2014.

BROWN, E. A.; CASEMORE, D. P.; GERKEN, A.; GREATORIX, I. F. Cryptosporidiosis in Great Yarmouth-the investigation of an outbreak. **Public Health**, London, v. 103, n. 1, p. 3-9, 1989.

BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET, L. E.; WALLINGA, J. A.; RUIJS, G. J.; BRUINS, M. J.; VERWEIJ, J. J. Parasitological diagnosis combining an internally controlled real-time PCR assay for the detection of four protozoa in stool samples with a testing algorithm for microscopy. **Clinical Microbiology and Infection**, New Jersey, v. 15, n. 9, p. 869-874, 2009.

BURAUD, M.; FORGET, E.; FAVENNEC, L.; BIZET, J.; GOBERT, J.; DELUOL, A. Sexual stages of development of Cryptosporidia in the Caco-2 cell line. **Infectious Immunology**, New Jersey, v. 59, p. 4610, 1991.

CABRAL, D. D.; BARBOSA, F. C.; STRASSER, C.; BARSOTTI, S. R. H. Exame de fezes de mamíferos silvestres para verificação de parasitismo por *Cryptosporidium* sp. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 7, n.1, p. 77-83, 2001.

CABRAL, A.; HIPOLITO, M.; CABRAL, D.; DA SILVA, N. OCORRÊNCIA DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium* spp. EM RÃS-TOURO (*Lithobates catesbeianus* SHAW, 1802), NO MUNICÍPIO DE UBERLÂNDIA, MG, BRASIL. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, março 2011. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/3087/8904>>. Acesso em: 12/10/2011.

CACCIÒ, S.; HOMAN, W.; CAMILLI, R.; TRALDI, G.; KORTBEEK, T.; POZIO, E. A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. **Parasitology**, Cambridge, v. 120, n. 3, p. 237-244, 2000.

CACCIÒ, S.; SPANO, F.; POZIO, E. Large variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C0 isolates of *Cryptosporidium parvum*. **International Journal of Parasitology**, Parkville, v. 31, n.10, p. 1082-1086, 2001.

CAMA, V. A.; ARROWOOD, M. J.; ORTEGA, Y. R.; XIAO, L. Molecular characterization of the *Cryptosporidium parvum* IOWA isolate kept in different laboratories. **Journal of Eucaryotic Microbiology**, London, v. 53, p. 40-42, 2006b.

CAREY C. M.; LEE H.; TREVORS J. T. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**, Lyngby, v. 38, p. 818-862, 2004.

CARIS, M. E.; ANDRADE, A. S.; PHILIPPI, L. S. Determinação do potencial de biorremediação de nutrientes e bioindicação de águas residuárias da suinocultura

por macrófitas flutuantes (*Lemna minuta*) – Efeito de altas taxas de nitrogênio amoniacal. **Evidência**, Joaçaba, v. 8, n. 1-2, p. 85-102, 2008.

CARVALHO-FILHO, P. R.; CARDOZO, S. V.; RIBEIRO, C. T.; MEDEIROS, S. M.; LOPES, C. W. Intestinal protozoan in apprehended New World nonhuman primates. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 354-361, 2006.

CASTRO-HERMIDA, J. A.; GARCÍA-PRESEDO, I.; GONZÁLEZ-WARLETA, M.; MEZO, M. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 30, n. 179, p. 216-219, 2011.

CHALMERS, R. M.; THOMAS, A. L.; BUTLER, B. A.; MOREL, M. C. Identification of *Cryptosporidium parvum* genotype 2 in domestic horses. **The Veterinary Record**, London, v. 156, p. 49-50, 2005.

CHAPPELL, C. L.; OKHUYSEN, P. C.; STERLING, C. R.; WANG, C.; JAKUBOWSKI, W. DUPONT, H. L. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 60, n. 1, p. 157-164, 1999.

CHEN, X. M.; KEITHLY, J. S.; PAYA, C. V.; LARUSSO, N. F. Cryptosporidiosis. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 346, p. 1723-1731, 2002.

COSTA-RIBEIRO, M. C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 8, p. 917-921, 2006.

CURRENT, W. L.; LONG, P. L. Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 148, p. 1108, 1983.

CURRENT, W. L.; GARCIA, L. S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 4, n. 3, p. 325-358, 1991.

DANN, S. M.; OKHUYSEN, P. C.; SALAMEH, B. M.; DUPONT, H. L.; CHAPPELL, C. L. Fecal antibodies to *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 9, p. 5068-5074, 2000.

D'ANTONIO, R. G.; WINN, R. E.; TAYLOR, J. P.; GUSTAFSON, T. L.; CURRENT, W. L.; RHODES, M. M.; GARY JR, G. W.; ZAJAC, R. A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 103, n. 6, p. 886-888, 1985.

DE WAELE, V.; BERZANO, M.; SPEYBROECK, N.; BERKVEN, D.; MULCAHY, G. M.; MURPHY, T. M. Peri-parturient rise of *Cryptosporidium* oocysts in cows: new insights provided by duplex quantitative real-time PCR. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 189, n. 2-4, p. 366-368, 2012.

DILLINGHAM, R. A.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. T. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, London, v. 4, p. 1059-1066, 2002.

DONOFRIO, R. S.; ARIDI, S.; SAHA, R.; BECHANKO, R.; SCHAEFER, K.; BESTERVELT, L. L.; HAMIL, B. Laboratory validation of an ozone device for recreational water treatment. **Journal of Water and Health**, London, v. 11, n. 2, p. 267-276, 2013.

DOWNEY, A. S.; GRACZYK, T. K. Maximizing recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from spiked eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissue samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, n. 21, p. 6910-6915, 2007.

EGGLESTON, M. T.; TILLEY, M.; UPTON, S. J. Enhanced development of *Cryptosporidium parvum* in vitro by removal of oocyst toxins from infected cell monolayers. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**. 1994, 61:118-121.

ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. Contemporary identification of previously reported novel *Cryptosporidium* isolates reveals *Cryptosporidium bovis* and the cervine genotype in sheep (*Ovis aries*). **Parasitology Research**, Washington, v. 102, p. 1103-1105, 2008.

FAGIOLINI, M.; LIA, R. P.; LARICCHIUTA, P.; CAVICCHIO, P.; MANNELLA, R.; CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D.; FINOTELLO, R.; PERRUCCI, S. Gastrointestinal parasites in mammals of two Italian zoological gardens. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, Yulee, v. 41, n. 4, p. 662-670, 2010.

FAHEY, T. Cryptosporidiosis. **Primary Care Update Ob/Gyns**, London, v. 10, p. 75-80, 2003.

FALL, A.; THOMPSON, R. C. A.; HOBBS, R. P.; MORGAN-RYAN, U. M. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium* parasites. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 2, p. 399-402, 2003.

FANFA, V. R.; FARRET, M. H.; SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G. Endoparasitos em puma (*Puma concolor*) na região sul do Brasil. **Acta Veterinária Brasileira**, Mossoró, v. 5, n. 1, p. 100-102, 2011.

FARRET, M. H.; FANFA, V. R.; SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G. Protozoários gastrointestinais em *Tayassu pecari* mantidos em cativeiro no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 1041-1044, 2010.

FARTHING, M. J. G. Clinical aspects of human cryptidiosis. **Contribution to Microbiology**, Zurich v. 6, p. 50-74, 2000.

FAST, N. M.; XUE, L.; BINGHAM, S.; KEELING, P. J. Re-examining Alveolate evolution using multiple protein molecular phylogeny. **Journal of Eukaryote Microbiology**, London, v. 49, p. 30-37, 2002.

FAYER, R.; FARLEY, C. A.; LEWIS, E. J.; TROUT, J. M.; GRACZYK, T. K. Potential role of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in the epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 5, p. 2086-2088, 1997.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, Parkville, v. 30, p. 1305-1322, 2000.

FAYER, R. *Cryptosporidium*: a waterborne zoonotic parasite. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, p. 37-56, 2004.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M.; GREINER, E. Prevalence species e genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2 years-old dairy cattle in eastern United States. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 135, p. 105-112, 2006.

FAYER, R.; SANTIN, M.; TROUT, J. M. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, p. 260-266, 2007.

FAYER, R.; UNGAR, B. L. P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. **Microbiological Reviews**, London, v. 50, p. 458-483, 1986.

FENG, Y. *Cryptosporidium* in wild placental mammals. **Experimental Parasitology**, London, v. 124, p. 128-137, 2010.

FIUZA, V.; ALMEIDA, A.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SANTÍN, M.; FAYER, R.; OLIVEIRA, F. C. Occurrence of *Cryptosporidium andersoni* in Brazilian Cattle. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 97, n. 5, p. 952-953, 2011a.

FIUZA, V. R.; COSENDEY, R. I.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; SANTÍN, M.; FAYER, R.; OLIVEIRA, F. C. Molecular characterization of *Cryptosporidium* in Brazilian sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 10, n. 175, p. 360-362, 2011b.

FRANCO, R. M.; ROCHA-EBERHARDT, R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 109-111, 2001.

FRANCY, D. S.; STELZER, E. A.; BRADY, A. M. G.; HUITGER, C.; BUSHON, R. N.; IP, H. S.; WARE, M. W.; VILLEGAS, E. N.; GALLARDO, V.; LINDQUIST, H. D. A. Comparison of Filters for Concentrating Microbial Indicators and Pathogens in Lake Water Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 4, p. 1342-1352, 2013.

FROST, F. J.; TOLLESTRUP, K.; GRAUN, G. F.; FAIRLEY, C. K.; SINCLAIR, M. I.; KUNDE, T. R. Protective immunity associated with a strong serological response to a

*Cryptosporidium*-specific antigen group, in HIV-infected individuals. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 192, n. 4, p. 618-621, 2005.

GALVÁN, A. L.; MAGNET, A.; IZQUIERDO, F.; FERNÁNDEZ VADILLO, C.; PERALTA, R.H.; ANGULO, S.; FENOY, S.; DEL AGUILA, C. A year-long study of *Cryptosporidium* species and subtypes in recreational, drinking and wastewater from the central area of Spain. **Science of the Total Environment**, London, v. 15, p. 368-75, 2014.

GARCÉS-SANCHEZ, G.; WILDERER, P. A.; MUNCH, J. C.; HORN, H.; LEBUHN, M. Evaluation of two methods for quantification of hsp70 mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples. **Water Research**, London, v. 43, n. 10, p. 2669-2678, 2009.

GATEI, W.; GREENSILL, J.; ASHFORD, R. W.; CUEVAS, L. E.; PARRY, C. M.; CUNLIFFE, N. A.; BEECHING, N. J.; HART, C. A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *Journal Clinical Microbiology*, Washington, v. 41, n. 4, p. 1458-1462.

GEURDEN, T.; CLAEREBOU, E.; VERCRUYSE, J.; BERKVEN, D. A Bayesian evaluation of four immunological assays for the diagnosis of clinical cryptosporidiosis in calves. **Veterinary Journal**, London, v. 176, n. 3, p. 400-402, 2008a.

GEURDEN, T.; THOMAS, P.; CASAERT, S.; VERCRUYSE, J.; CLAEREBOU, E. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in lambs and goat kids in Belgium. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, p. 142-145, 2008b.

GEURDEN, T.; GOOSSENS, E.; LEVECKE, B.; VERCAMMEN, F.; VERCRUYSE, J.; CLAEREBOU, E. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in captive wild ruminants in Belgium. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v. 40, n. 1, p. 126-130, 2009.

GIANGASPERO, A.; LORIO, R.; PAOLETTI, B.; TRAVERSA, D.; CAPELLI, G. Molecular evidence for *Cryptosporidium* infection in dogs in Central Italy. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 99, p. 297-299, 2006.

GOLDSTEIN, S. T.; JURANEK, D. D.; RAVENHOLT, O.; HIGHTOWER, A. W.; MARTIN, D. G.; MESNIK, J. L.; GRIFFITHS, S. D.; BRYANT, A. J.; REICH, R. R.; HERWALDT, B. L. Cryptosporidiosis: an outbreak associated with drinking water despite state of the art water treatment. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 15, n. 125, p. 158, 1996.

GOMES, R.S.; HUBER, F.; SILVA, S.; BOMFIM, T.C. *Cryptosporidium* spp. parasitize exotic birds that are commercialized in markets, commercial aviaries, and pet shops. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 110, n. 4, p. 1363-1370, 2012.



GOMEZ, M. S.; GRACENEA, M.; GOSALBEZ, P.; FELIU, C.; ENSEÑAT, C.; HIDALGO, R. Detection of oocysts of *Cryptosporidium* in several species of monkeys and in one prosimian species at the Barcelona Zoo. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 78, p. 619-620, 1992.

GOMEZ, M. S.; GOMEZ, M. S.; VILA, T.; FELIU, C.; MONTOLIU, I.; GRACENEA, M.; FERNANDEZ, J. A survey for *Cryptosporidium* spp. mammals at the Barcelona Zoo. **International Journal for Parasitology**, London, v. 26, p. 1331-1333, 1996.

GOMEZ, M. S.; TORRES, J.; GRACENEA, M.; FERNÁNDEZ-MORÓN, J.; GONZALES-MORENO, O. Further report on *Cryptosporidium* in Barcelona zoo mammals. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 86, p. 318-323, 2000.

GONZALEZ-MORENO, O.; HERNANDEZ-AGUILAR, R. A.; PIEL, A. K.; STEWART, F. A.; GRACENEA, M.; MOORE, J. Prevalence and climatic associated factors of *Cryptosporidium* sp. infections in savanna chimpanzees from Ugalla, Western Tanzania. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 112, n. 1, p. 393-399, 2013.

GRACENEA, M.; GOMEZ, M. S.; TORRES, J.; CARNÉ, E.; FERNÁNDEZ-MORÁN, J. Transmission dynamics of *Cryptosporidium* in primates and herbivores at the Barcelona zoo: a long-term study. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 104, p. 19-26, 2002.

GRINBERG, A.; LEARMONTH, J.; KWAN, E.; POMROY, W.; LOPEZ VILLOBOS, N.; GIBSON, L.; WIDMER, G. Genetic diversity and zoonotic potential of *Cryptosporidium parvum* causing foal diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, p. 2396-2398, 2008a.

GUYOT, K.; FOLLET-DUMOULIN, A.; RECOURT, C.; LELIÈVRE, E.; CAILLIEZ, J.C.; DEI-CAS, E. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of a diagnostic 452-base-pair ENA fragment discriminates between *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis* and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 2071-2076, 2002.

HAAS C. N.; ROSE J.B. **Reconciliation of microbial risk models and outbreak epidemiology: the case of Milwaukee outbreak**. In: Proceeding of the 1994 Annual Conference: Water Quality. Published in New York, 1994. American Water Works Assoc. pp. 517-523.

HAQUE, R.; ROY, S.; SIDDIQUE, A.; MONDAL, U.; RAHMAN, S. M.; MONDAL, D.; HOUP, E.; PETRI JR, W. A. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 76, n. 4, p. 713-717, 2007.

HARP, J. A.; FAYER, R.; PESCH, B. A. JACKSON, G. J. Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2866-2868, 1996.

HAYES, E. B.; MATTE, T. D.; O'BRIEN, T. R.; MCKINLEY, T. W.; LOGSDON, G. S.; ROSE, J. B.; UNGAR, B. L.; WORD, D. M.; PINSKY, P. F.; CUMMINGS, M. L. A large community outbreak of cryptosporidiosis due the contamination of a filtered public water supply. **New England Journal of medicine**, Massachusetts, v. 320, p. 1372-1376, 1989.

HEUSCHELE, W. P.; OOTERHUIS, J.; JANSSEN, D.; ROBINSON, P. T.; ENSLEY, P. K.; MEIER, J. E.; OLSON, T.; ANDERSON, M. P.; BENIRSCHKE, K. Cryptosporidial infections in captive wild animals. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 22, n. 4, p. 493-96, 1986.

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; MORGAN, U. M.; THOMPSON, R. C. A. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. **International Journal of Parasitology**, Parkville, v. 31, p.1048–1055, 2001.

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; MORGAN, U. M.; OLSON, M. E.; THOMPSON, R. C. A. Successful *in vitro* cultivation of *Cryptosporidium andersoni* with evidence for the existence of novel extracellular stages in the *Cryptosporidium* life cycle. **International Journal for Parasitology**, Parkville, v. 32, p. 1719–1726, 2002.

HIJJAWI, N. S.; MELONI, B. P.; NG'ANZO, M.; RYAN, U. M.; OLSON, M. E.; COX P. T.; MONIS, P. T.; THOMPSON, R.C. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. **International Journal for Parasitology**, Parkville, v. 34, n. 7, p. 769-777, 2004.

HIJJAWI, N.; ESTCOURT, A.; YANG, R; MONIS, P.; RYAN, U. Complete development and multiplication of *Cryptosporidium hominis* in cell free culture. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.19, n. 169, p. 29-36, 2010.

HILL, N.; DEANE, E. M.; POWER, M. L. Prevalence and Genetic Characterization of *Cryptosporidium* Isolates from Commom Brushtail Possums (*Trichosurus vulpecula*) Adapted to Urban Settings. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 17, p. 5549-5555, 2008.

HOAR, B. R.; ATWILL, E. R.; ELM, C.; UTTERBACK, W. W.; EDMONDSON, A. J. Comparison of fecal samples collected per rectum and off the ground for estimation of environmental contamination attributable to beef cattle. **American Journal of Veterinary Research**, New York, v. 60, n. 11, p. 1352-1356, 1999.

HOFSTRA, N.; BOUWMAN, A. F.; BEUSEN, A. H.; MEDEMA, G.J. Exploring global *Cryptosporidium* emissions to surface water. **Science of the Total Environment**, London, v. 1, n. 442, p. 10-19, 2013.

HOLSBACK, L.; CARDOSO, M. J. L.; FAGNANI, R.; PATELLI, T. H. C. Natural infection by endoparasites among free-living wild animals. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 302-306,.

HONG, D.K.; WONG, C.J.; GUTIERREZ, K. Severe cryptosporidiosis in a seven-year-old renal transplant recipient: Case Report and review of the literature. **Pediatric Transplantation**. 2007; 11: 94-100.

HOPKINS, J.; HAGUE, H.; HUDGIN, G.; ROSS, L.; MOORE, D. An outbreak of *Cryptosporidium* at a recreational water park in Niagara Region, Canada. **Journal of Environmental Health**, Denver, v. 75, n. 9, p. 28-33, 2013.

HOU, L.; LI, X.; DUNBAR, L.; MOELLER, R.; PALERMO, B.; ATWILL, E.R. Neonatal-mouse infectivity of intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after optimized in vitro excystation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 642-646, 2004.

HOXIE, N. J.; DAVIS, J. P.; VERGERONT, J. M.; NASHOLD, R. D.; BLAIR, K. A. Cryptosporidiosis-Associated Mortality Following a Massive Waterborne Outbreak in Milwaukee, Wisconsin". **American Journal of Public Health**, Washington, v. 87, n. 12, p. 2032–2035, 1997.

HUNTER, P. R.; NICHOLS, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infections in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, p. 145-154, 2002.

HUANG, D. B.; WHITE, A. C. An update review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. **Gastroenterology Clinical of North America**, London, v. 35, n. 2, p. 291-314, 2006.

ISSAC-RENTON, J.; BLATHERWICK, J.; BOWIE, W.R.; FYFE, M.; KHAN, M.; LI, A.; KING, A.; MCLEAN, M.; MEDD, L.; MOOREHEAD, W.; ONG, C. S.; ROBERTSON, W. Epidemic and endemic seroprevalence of antibodies to *Cryptosporidium* and *Giardia* in residents of three communities with different drinking water supplies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 60, n. 4, p. 578-583, 1999.

JANOUSKOVEC, J.; HORAK, A.; OBORNIK, M.; LUKES, J.; KEELING, P. J. A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Boston, v. 107, p. 10949-10954, 2010.

JEX, A. R.; SMITH, H. V.; MONIS, P. T.; CAMPBELL, B. E.; GASSER, R. B. *Cryptosporidium* – biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, London, v. 26, p. 304-317, 2008.

JOHNSON, J.; BUDDLE, R.; REID, S.; ARMSON, A.; RYAN, U. M. Prevalence of *Cryptosporidium* genotypes in pre and post-weaned pigs in Australia. **Experimental Parasitology**, London, v. 119, p. 418-421, 2008.

KANG'ETHE, E. K.; KIMANI, V. N.; MCDERMOTT, B.; GRACE, D.; LANG'AT, A. K.; KIRAGU, M. W.; KARANJA, N.; NJEHU, A. N.; RANDOLPH, T.; MBUGUA, G.; IRUNGU, T. W.; OMBUTU, P. A trans-disciplinary study on the health risks of cryptosporidiosis from dairy systems in Dagoretti, Nairobi, Kenya: study background

and farming system characteristics. **Tropical Animal Health and Production**, Springer Berlin, v. 44, p. 3-10, 2012.

KAR, S.; GAWLOWSKA, S.; DAUGSCHIES, A.; BANGOURA, B. Quantitative comparison of different purification and detection methods for *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Journal of Veterinary Parasitology**, London, v. 177, p. 366-370, 2011.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**. 2007a; 5(1): 1-38.

KARANIS, P.; PLUTZER, J.; HALIM, N. A.; NAGASAWA, H.; ONGERTH, J.; LIQING, M. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from animal sources in Qinghai province of China. **Parasitology Research**, London, v. 101, p. 1575-1580, 2007b.

KARANIS P.; THEKISOE O.; KIOUPTSI K.; ONGERTH J.; IGARASHI I.; INOUE N. Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water samples. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 17, p. 5660-5662, 2007.

KASSA, H.; HARRINGTON, B. J.; BISESI, M. S. Cryptosporidiosis: a brief literature review and update regarding *Cryptosporidium* in feces of Canada geese (*Branta canadensis*). **Journal of Environmental Health**, Denver, v. 66, n. 7, p. 34-40, 2004.

KAUPKE, A.; KWIT, E.; CHALMERS, R. M.; MICHALSKI, M. M.; RZEŻUTKA, A. An outbreak of massive mortality among farm rabbits associated with *Cryptosporidium* infection. **Research in Veterinary Science**, London, v. 97, n., p. 85-87, 2014.

KIMURA, A.; SUZUKI, Y.; MATSUI, T. Identification of the *Cryptosporidium* isolate from chickens in Japan by sequence analyses. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tsukuba, v. 66, n. 7, p. 879-881, 2004.

KIRKPATRICK, B. D.; GAQUE, R.; DUGGAL, P. Association between *Cryptosporidium* infection human leukocyte antigen class I and Class II alleles. **Journal of Infectious Diseases**, Washington, v. 197, n. 3, p. 474-478, 2008.

KODÁDKOVÁ, A.; KVÁC, M.; DITRICH, O.; SAK, B.; XIAO, L. *Cryptosporidium muris* in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). **The Journal of Parasitology**, Indiana, v. 96, n. 1, p. 211-212, 2010.

KOOMPAPONG, K.; SUKTHANA, Y. Seasonal variation and potential sources of *Cryptosporidium* contamination in surface waters of Chao Phraya River and Bang Pu Nature Reserve pier, Thailand. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Tailândia, v. 43, n. 4, p. 832-840, 2012.

KOTHAVADE, R. J. Potential molecular tools for assessing the public health risk associated with waterborne *Cryptosporidium* oocysts. **Journal of Medical Microbiology**, Dublin, v. 61, n. 8, p. 1039-1051, 2012.

KOWALEWSKI, M. M.; SALZER, J. S.; DEUTSCH, J. C.; RAÑO, M.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; GILLESPIE, T. R. Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. **American Journal of Primatology**, London, v. 73, n. 1, p. 75-83, 2011.

KUHN, R. C.; ROCK, C. M.; OSHIMA, K. H. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Wild Ducks along the Rio Grande River Valley in Southern New Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 1, p. 161-165, 2002.

LACHARME, L.; VILLAR, V.; ROJO-VAZQUEZ, F. A.; SUAREZ, S. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in rabbit chondrocytes (VELI cells). **Microbes and Infection**, London, v. 6, p. 566-571, 2004.

LAL, A.; BAKER, M. G.; HALES, S.; FRENCH, N. P. Potential effects of global environmental changes on cryptosporidiosis and giardiasis transmission. **Trends in Parasitology**, London, v. 29, n. 2, p. 83-90, 2013.

LALLO, M. A.; PEREIRA, A.; ARAÚJO, R.; FAVORITO, S. E.; BERTOLLA, P.; BONDAN, E. F. Ocorrência de *Giardia*, *Cryptosporidium* e microsporídeos em animais silvestre em área de desmatamento no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1465-1470, 2009.

LANGKJAER, R. B.; VIGRE, H.; ENEMARK, H. L.; MADDOX-HYTTEL, C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. **Parasitology**, Cambridge, v. 134, p. 339-350, 2007.

LEANDER, B. S. Marine gregarines: evolutionary prelude to the apicomplexan radiation? **Trends in Parasitology**, London, v. 24, p. 60-67, 2007a.

LEE, J. J.; PAWLOWSKI, J.; DEBENAY, J. P.; WHITTAKER, J.; BANNER, F.; GOODAY, A. J.; TENDAL, O.; HAYNES, J.; FABER, W. W. Phylum Granuloreticulosa. In: LEE, J. J.; LEEDALE, G. F.; BRADBURY, P. An illustrated Guide to the Protozoa. Lawrence: Kansas, 2000. p. 872-951.

LEE, Y. T.; TSAIHONG, J. C.; TSENG, Y. C.; TSAI, C. M.; PENG, S. Y. Development of PCR-RFLP method to distinguish between *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis* in Taiwan water samples. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Tailândia, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2013.

LEMOS, V.; GRACZYK, T. K.; ALVES, M.; LOBO, M. L.; SOUSA, M. C.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Identification and determination of the viability of *Giardia lamblia* cysts and *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts in human fecal and water supply samples by fluorescent in situ hybridization (FISH) and monoclonal antibodies. **Parasitology Research**, London, v. 98, n. 1, p. 48-53, 2005.

LEONI, F.; GÓMEZ-COUSO, H.; ARES-MAZÁS, M. E.; MCLAUCLIN, J. Multilocus genetic analysis of *Cryptosporidium* in naturally contaminated bivalve molluscs. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 103, n. 6, p. 2430-2437, 2007.

LEVINE, N. D. Some correction of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 66, n. 5, p. 830-834, 1980.

LEVINE, N. D. CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKI, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly Revised Classification of the Protozoa. The Committee on Systematics and Evolution of the Society of Protozoologists. **Journal of Protozoology**, University of Guelph, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LIM, Y. A.; NGUI, R.; SHUKRI, J.; ROHELA, M.; MAT NAIM, H. R. Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.157, p.154-159, 2008.

LUDWIG, R.; MARQUES, S. M. T. Primeiro relato de *Cryptosporidium* spp. em emas (*Rhea americana*) cativas de zoológico do Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 63, p. 76-80, 2008.

LUDWIG, R.; MARQUES, S. M. T. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in mammals at a zoo in southern Brasil. **Revista Ibero-Latinoamericana**, Granada, v. 70, n. 1, p. 122-128, 2011.

LUPO, P. J.; LANGER-CURRY, R. C.; ROBINSON, M.; OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L. *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 78, n. 6, p. 917-921, 2008.

MAC KENZIE, W. R.; HOXIE, N. J.; PROCTOR, M. E.; GRADUS, M. S.; BLAIR, K. A.; PETERSON, D. E.; KAZMIERCZAK, J. J.; ADDISS, D. G.; FOX, K. R.; ROSE, J. B.; DAVIS, J. P. *Cryptosporidium* infection from Milwaukee's public water supply: a massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **The New England of Medicine**, Massachusetts, v. 331, n. 3, p. 162-167, 1994.

MATSUBAYASHI, M.; TAKAMI, K. L.; NAKANISHI, T. TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Survey of *Cryptosporidium* spp. infections in various animals at zoo in Japan. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v. 36, p. 331-335, 2005.

MATTSSON, J. G.; INSULANDER, M.; LEBBAD, M.; BJÖRKMAN, C.; SVENUNGSSON, B. Molecular typing of *Cryptosporidium parvum* associated with a

diarrhoea outbreak identifies two sources of exposure. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 136, n. 8, p. 1147-1152, 2007.

MCLAUCHLIN, J. S.; PEDRAZA-DIAZ, C.; AMAR-HOETZENEDER, NICHOLS, G. L. The genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 3153–3158, 1999.

MEAD, R. J. Prospects for immunotherapy and vaccines against *Cryptosporidium*. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, London, v. 10, n. 6, p. 1–9, 2014.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; DOS SANTOS, M. M.; GENNARI, S. M. Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 92, n.3, p. 623-626, 2006.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; BONELLO, F.; GENNARI, S. M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in capybara (*Hydrochoerus hydrochoerus*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 147, p. 166-170, 2007.

MEIRELES, M. V.; OLIVEIRA, F. P.; TEIXEIRA, W. F.; COELHO, W. M.; MENDES, L. C. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from the state of São Paulo, Brazil. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 109, n. 3, p. 949-951, 2011.

MEISEL, J. L.; PERERA, D. R.; MELIGRO, C.; RUBIN, C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, London, v. 70, p. 1156-1160, 1976.

MINAROVICOVÁ, J.; KACLÍKOVÁ, E.; KRASCSENICSOVÁ, K.; SIEKEL, P.; KUČHTA, T. A single-tube nested real-time polymerase chain reaction for sensitive contained detection of *Cryptosporidium parvum*. **Letter Applied Microbiology**, London, v. 49, n. 5, p. 568-572, 2009.

MISIC, Z.; ABE, N. Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. **Parasitology**, Seul, v. 134, p. 351–358, 2007.

MONIS, P. T.; ANDREWS, R. H. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. **International Journal for Parasitology**, London, v. 28, p. 981-987, 1998.

MOON, S.; KWAK, W.; LEE, S.; KIM, W.; OH, J.; YOUN, S. K. Epidemiological Characteristics of the First Water-Borne Outbreak of Cryptosporidiosis in Seoul, Korea. **Journal of Korean Medicine Science**, Seul, v. 28, n. 7, p. 983-989, 2013.

MOORE, R. B.; OBORNIK, M.; JANOUSKOVEC, J.; CHRUDIMSKY, T.; VANCOVA, M.; GREEN, D. H.; WRIGHT, S. W.; DAVIES, N. W.; BOLCH, C. J. S.; HEIMANN, K.; SLAPETA, J.; HOEGH-GULDBERG, O.; LOGSDON, J. M.; CARTER, D. A. A

photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. **Nature**, New York, v. 451, p. 959-963, 2008.

MORGAN, U. M.; CONSTANTINE, C. C.; O'DONOGHUE, P.; MELONI, B. P.; O'BRIEN, P. A.; THOMPSON, R. C. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 52, n. 6, p. 559-564, 1995.

MORGAN, U. M.; PHILIP, A.; O'BRIEN, R. C.; THOMPSON, A. The development of diagnostic PCR primers for *Cryptosporidium* using RAPD-PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, London, v. 77, p. 103-108, 1996.

MORGAN, U. M.; MONIS, P. T.; FAYER, R.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R. C. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, n. 6, p. 1126-1133, 1999a.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; FAYER, R.; GRACZYK, T. K.; LAL, A. A.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R. C. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from captive reptiles using 18S rDNA sequence data and random amplified polymorphic DNA analysis. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, n. 3, p. 525-530, 1999.

MORGAN, U. M.; XIAO, L.; LIMOR, J.; GELIS, S.; RAIDAL, S. R.; FAYER, R.; LAL, A.; ELLIOT, A.; THOMPSON, R. C. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). **Australian Veterinary Journal**, London, v. 78, n. 3, p. 182-183, 2000.

MORRISON, D. A. Phylogenetic analyses of parasites in the new millennium. **Advances in Parasitology**, Orlando, v. 63, p. 1-124, 2006.

MORRISON, L. J.; MALLON, M. E.; SMITH, H. V.; MACLEOD, A.; XIAO, L.; TAIT, A.; The population structure of the *Cryptosporidium parvum* population in Scotland: A complex picture. **Infection, Genetics and Evolution**, Bangkok, v. 8, p. 121-129, 2008.

MOSS, D. M.; CHAPPELL, C. L.; OKHUYSEN, P. C. The antibody response to 27, 17, and 15-kDa *Cryptosporidium* antigens following experimental infection in humans. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 178, n. 3, p. 827-833, 1998.

MUELLER-DOBLIES, D.; GILES, M.; ELWIN, K.; SMITH, R. P.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; CHALMERS, R. M. Distribution of *Cryptosporidium* species in sheep in the UK. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 154, p. 214-219, 2008.

NAKAMURA, A. A.; SIMÕES, D. C.; ANTUNES, R. G.; DA SILVA, D. C.; MEIRELES, M. V. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 3, n. 166, p. 47-51, 2009.



NASCIMENTO, W. R. C.; CAVALCANTI, I. M. F.; IRMÃO, J. I.; ROCHA, F. J. S. Presença de *Cryptosporidium* spp em crianças com diarreia aguda em uma creche pública de Recife, Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 175-178, 2009.

NEWMAN, R. D.; WUHIB, T.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L.; SEARS, C. L. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 49, n. 2, p. 270-275, 1993.

NĚMEJC, K.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D.; HANZAL, V.; JANISZEWSKI, P.; FOREJTEK, P.; RAJSKÝ, D.; RAVASZOVÁ, P.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) in Central Europe. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 8; n. 197, p. 504-508, 2013.

NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 72, n. 12, p. 7548-7553, 2006.

NGUYEN, S. T.; FUKUDA, Y.; TADA, C.; HUYNH, V. V.; NGUYEN, D. T.; NAKAI, Y. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in ostriches (*Struthio camelus*) on a farm in central Vietnam. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 133, n. 1, p. 8-11, 2013.

NIME, F. A.; BUREK, J. D.; PAGE, D. L.; HOLSCHER, M. A.; YARDLEY, J. H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, London, v. 70, p. 592-598, 1976.

NISHI L.; BERGAMASCO, R.; TOLEDO, M. J.; FALAVIGNA, D. L.; GOMES, M. L.; MOTA, L. T.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. In the Ivaí Indigenous Land, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, New York, v. 9, n. 5, p. 543-547, 2009.

NORMAN, S. A.; HOBBS, R. C.; WUERTZ, S.; MELLI, A.; BECKETT, L. A.; CHOUICHA, N.; KUNDU, A.; MILLER W. A. Fecal pathogen pollution: sources and patterns in water and sediment samples from the upper Cook Inlet, Alaska ecosystem. **Environmental Science Process & Impacts**, London, v. 1, n. 15, p. 1041-1051, 2013.

OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L.; CRABB, J. H.; STERLING, C. R.; DUPONT, H. L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 180, p. 1275-1281, 1999.

OLIVEIRA, C. B.; SOARES, F. J.; SILVA, A. S.; SILVA, M. K.; SALOMÃO, E. L.; MONTEIRO, S. G. Ocorrência de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Leopardus weidii* de vida livre. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 546-547, 2008.

OLIVEIRA, F. C.; EDERLI, N. B.; EDERLI, B. B.; ALBUQUERQUE, M. C.; DOS SANTOS, M. D. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in ostriches, *Struthio camelus* L., 1758 (Aves, Struthionidae)

reared in North and Lowered Coastline regions of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 322-325, 2008.

OLSON, M. E.; O'HANDLEY, R. M.; RALSTON, B. J.; MCALLISTER, T. A.; THOMPSON, R. C. A. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. **Trends in Parasitology**, London, v. 20, n. 4, p. 185-191, 2011.

ONICHANDRAN, S.; KUMAR, T.; SALIBAY, C. C.; DUNGCA, J. Z.; TABO, H. A.; TABO, N.; TAN, T. C.; LIM, Y. A.; SAWANGJAROEN, N.; PHIRIYASAMITH, S.; ANDIAPPAN, H.; ITHOI, I.; LAU, Y. L.; NISSAPATORN, V. Waterborne parasites: a current status from the Philippines. **Parasites & Vectors**, Springer Berlin, v. 28, n. 7, p. 244-251, 2014.

OSAKI, S. C. *Cryptosporidium* spp: Desenvolvimento de técnicas moleculares e imunológicas para a detecção de oocistos em água e avaliação da sua remoção pelos métodos convencionais de tratamento da água. 174f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OSAKI, S. C.; SOCCOL, V. T.; COSTA, A. O.; OLIVEIRA-SILVA, M. B.; PEREIRA, J. T.; PROCÓPIO, A. E. Polymerase chain reaction and nested-PCR approaches for detecting *Cryptosporidium* in water catchments of water treatment plants in Curitiba, State of Paraná, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 46, n. 3, p. 270-276, 2013.

PANCIERA, R. J.; THOMASSEN, R. W.; GARNER, F. M. Cryptosporidiosis in a calf. **Veterinary Pathology**, Auburn, v. 8, p. 479-484, 1971.

PAPINI, R.; GIRIVETTO, M.; MARANGI, M.; MANCIATI, F.; GIANGASPERO, A. Endoparasite infections in pet and zoo birds in Italy. **The Scientific World Journal**, Cairo, p. 1-9, 2012.

PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P. K.; RAO, P. V.; MORITA, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Virology**. London, v. 18, n. 6, p. 407-421, 2008.

PARR, J. B.; SEVILLEJA, J. E.; SAMIE, A.; ALCANTARA, C.; STROUP, S. E.; KOHLI, A.; FAYER, R.; LIMA, A. A.; HOUP, E. R.; GUERRANT, R. L. Detection and quantification of *Cryptosporidium* in HCT-8 cells and human fecal specimens using real-time polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 76, n. 5, p. 938-942, 2007.

PAZIEWSKA, A.; BEDNARSKA, M.; NIEWEGLOWSKI, H.; KARBOWIAK, G.; BAJER, A. Distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. In selected species of protected and game mammals from North-Eastern Poland. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, London, v. 14, p. 265-270, 2007.

PEREIRA, J. T.; COSTA, A. O.; SILVA, M. B. O.; SCHUCHARD, W.; OSAKI, S. C.; CASTRO, E. A. C.; PAULINO, R. C.; SOCCOL, V. T. Comparing the Efficacy of Chlorine, Chlorine Dioxide, and Ozone in the Inactivation of *Cryptosporidium parvum* in Water from Parana State, Southern Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Springer Berlin, v. 151, p. 464-473, 2008.

PÉREZ CORDÓN, G. P.; PRADOS, A. H.; ROMERO, D.; MORENO, M. S.; PONTES, A.; OSUNA, A. ROSALES, M. J. Intestinal parasitismo in the animals of zoological Garden "Peña Escrita" (Almuñecar, Spain). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.156, p. 302-309, 2008.

PIRESTANI, M.; SADRAEI, J.; DALIMI, A. A.; ZAVVAR, M.; VAEZNIA, H. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from human and bovine using 18S rRNA gene in Shahriar county of Tehran, Iran. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 103, n. 2, p. 467-472, 2008.

PRITCHARD, G. C.; MARSHALL, J. A.; GILES, M.; MUELLER-DOBLIES, D.; SAYERS, A. R.; MARSHALL, R. N.; ELWIN, K.; CHALMERS, R. M. *Cryptosporidium* species in lambs submitted for diagnostic postmortem examination in England and Wales. **Veterinary Record**, London, v. 163, p 688-689, 2008.

PUTIGNANI, L.; MENCHELLA, D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Cairo, v. 1, p. 1-39, 2010.

QI, M.; WANG, R.; NING, C.; LI, X. ZHANG, L.; JIAN, F.; SUN, Y. XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. In pet birds: Genetic diversity and potential public health significance. **Experimental Parasitology**, London, v. 128, n.4, p. 336-340, 2011.

QIAN, S. S.; LINDEN, K.; DONNELLY, M. A Bayesian analysis of mouse infectivity data to evaluate the effectiveness of using ultraviolet light as a drinking water disinfectant. **Water Research**, Lyngby, v. 39, n. 17, p. 4229-4239, 2005.

QUADROS, R. M.; MARQUES, S. M. T.; AMENDOEIRA, C. R.; SOUZA, L. A.; AMENDOEIRA, P. R.; COMPARIN, C. C. Detection of *Cryptosporidium* oocysts by auramine and Ziehl Neelsen staining methods. **Parasitología Latinoamericana**, Santiago, v. 61, p. 117-120, 2006.

QUAH, J. X.; AMBU, S.; LIM, Y. A.; MAHDY, M. A.; MAK, J. W. Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* from avian hosts. **Parasitology**, Cambridge, v. 138, n. 5, p. 573-577, 2011.

QUÍLEZ, J.; TORRES, E.; CHALMERS, R. M.; HADFIELD, S. J.; DEL CACHO, E.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 19, p. 6026-6031, 2008.

RASAMBAINARIVO, F. T.; GILLESPIE, T. R.; WRIGHT, P. C.; ARSENAULT, J.; VILLENEUVE, A.; LAIR, S. Survey of *Giardia* and *Cryptosporidium* in lemurs from the

Ranomafana National Park, Madagascar. **Journal of Wildlife Diseases**, Lawrence, v. 49, n. 3, p. 741-743, 2013.

RASMUSSEN, K. R.; LARSEN, N. C.; HEALEY, M. C. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. **Infectious Immunology**, Washington, v. 61, p. 1482, 1993.

RAVASZOVA, P.; HALANOVA, M.; GOLDOVA, M.; VALENCAKOVA, A.; MALCEKOVA, B.; HURNÍKOVÁ, Z.; HALAN, M. Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 110, n. 1, p. 469-471, 2012.

RICHTER, B.; FRAGNER, K.; WEISSENBOCK, H. Simultaneous detection of protozoa in the tissues of snakes by Double in situ hybridization. **Microscopy Research and Technique**, London, v. 71, n. 4, p. 257-259, 2008a.

RICHTER, B.; KÜBBER-HEISS, A.; WEISSENBOCK, H.; SCHMIDT, P. Detection of *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. and *Monocercomonas* spp. in the gastrointestinal tract of snakes by in-situ hybridization. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 138, n. 2-3, p. 63-67, 2008b.

RIEUX, A.; PARAUD, C.; PORS, I.; CHARTIER, C. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from beef calves under one month of age over three successive years in one herd in western France. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 28; n. 202, p. 171-179, 2014.

ROBINSON, G.; CHALMERS, R. M.; STAPLETON, C.; PALMER, S. R.; WATKINS, J.; FRANCIS, C.; KAY, D. A whole water catchment approach to investigating the origin and distribution of *Cryptosporidium* species. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 111, n. 3, p. 717-730, 2011.

ROHELA, M.; LIM, Y. A.; JAMAIAH, I.; KHADIJAH, P. Y.; LAANG, S. T.; NAZRI, M. H. NURULHUDA, Z. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in Wrinkled Hornbill and other birds in the Kuala Lumpur National Zoo. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Tailândia, v. 36, n. 4, p. 34-40, 2005.

RONQUIST, F., HUELSENBECK, J. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics Applications Note**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.

RUECKER, N. J.; MATSUNE, J. C.; WILKES, G.; LAPEN, D. R.; TOPP, E.; EDGE, T. A.; SENSEN, C. W.; XIAO, L.; NEUMANN, N. F. Molecular and phylogenetic approaches for assessing sources of *Cryptosporidium* contamination in water. **Water Research**, Lyngby, v. 15, n. 46, p. 5135-5150, 2012.

RUECKERT, S.; SIMDYANOV, T. G.; ALEOSHIN, V. V.; LEANDER, B. S. Identification of a Divergent Environmental DNA Sequence Clade Using the Phylogeny of Gregarine Parasites (Apicomplexa) from Crustacean Hosts. **Trends in Parasitology**, London, v. 22, p. 469-474, 2011.

RYAN, U.; XIAO, L.; READ, C.; ZHOU, L.; LAL, A. A.; PAVLASEK, I. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4302-4307, 2003a.

RYAN, U. M.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDDLE, J. R.; ROBERTSON, I. D.; THOMPSON, R. C. Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3970-3974, 2003b.

RYAN, U. M.; BATH, C.; ROBERTSON, I.; READ, C.; ELLIOT, A.; MCLNNE, L.; TRAUB, R.; BESIER, B. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4992-4997, 2005b.

SAK, B.; PETRZELKOVA, K. J.; KVETONOVA, D.; MYNAROVA, A.; SHUTT, K. A.; POMAJBIKOVA, K.; KALOUSOVA, B.; MODRY, D.; BENAVIDES, J.; TODD, A.; KVAC, M. Long-Term Monitoring of Microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at Different Stages of Habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. **Plos One**, São Francisco, v. 8, n. 8, p. e71840, 2013.

SLAPETA, J. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? **International Journal for Parasitology**, Parkville, v. 43, n. 12-13, p. 957-970, 2013.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 71, n. 3-4, p. 359-385, 2000.

SANTIN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species and genotypes in sheep in Maryland. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 146, p. 17-24, 2007.

SANTIN, M.; TROUT, J. M.; FAYER, R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 155, p. 15-23, 2008.

SANTIN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **New Zealand Veterinary Journal**, Nova Zelândia, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2013.

SARKAR, R.; AJJAMPUR, S. S.; MULIYIL, J.; WARD, H.; NAUMOVA, E. N.; KANG, G. Serum IgG responses and seroconversion patterns to *Cryptosporidium* gp15 among children in a birth cohort in south India. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 19, n. 6, p. 849-854, 2012.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected diseases initiative". **Trends in Parasitology**, London, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

SCHLUNDT, J.; TOYOFUKU, H.; JANSEN, J.; HERBST, S. A. Emerging food-borne zoonoses. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, n. 23, p. 513-533, 2004.

SCHULZE, C.; KÄMMERLING, J.; KUTZER, P.; ENGELHARDT, A.; RICHTER, B. *Cryptosporidium baileyi*-infection in Red-breasted Merganser (*Mergus serrator*) ducklings from a zoological garden. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, Berlin, v. 125, n. 9-10, p. 428-431, 2012.

SEMA. Bacias hidrográficas do Paraná: uma série histórica. 2010. Disponível em:< <http://www.aguasparana.pr.gov.br/arquivos/File/BACIAS/iguacu.pdf>>. Acesso em: 15 jun 2014.

SEMENZA, J. C.; NICHOLS, G. Cryptosporidiosis surveillance and water-borne outbreaks in Europe. **Euro Surveillance**, Estocolmo, v. 12, n. 5, p. 13-14, 2007.

SEVÁ, A. P.; FUNADA, M. R.; SOUZA, S. O.; NAVA, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from domestic animals in a rural area surrounding Atlantic dry forest fragments in Teodoro Sampaio municipality, State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 249-53, 2010.

SEVÁ A. P.; FUNADA, M. R.; RICHTZENHAIN, L.; GUIMARÃES, M. B.; SOUZA, S. O.; ALLEGRETTI, L.; SINHORINI, J.; DUARTE, V. V.; SOARES, R. M. Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, n. 1-2, p. 27-32, 2011.

SILVA, A. S.; SOARES, C.D.M.; GRESSLER, L.T.; LARA, V.M.; CARREGARO, A.B.; MONTEIRO, S.G. Criptosporidíase gastrointestinal em tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*). **Zoociências**, Juiz de Fora, v. 10, n. 2, p. 175-177, 2008a.

SILVA, A. S.; SOARES, C. D. M.; CORADINI, G. P.; GRESSLER, L. T.; LARA, SOARES, J. F.; LARA, V. M.; CARREGARO, A. B.; MONTEIRO, S. G. Ocorrência de protozoários gastrointestinais em primatas mantidos em cativeiro na região sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2658-2661, 2008b.

SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G.; SILVA, M. K.; SOARES, C. D. M.; OLIVEIRA, C. B.; LIMA, F. P.; ZANETTE, R. A.; SOUZA, C. P.; SALOMÃO, E. L. Parasitismo por *Cryptosporidium* spp. em psitacídeos mantidos em cativeiro no município de Cachoeira do Sul – RS, Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.15, n. 2, p. 234-238, 2008c.

SILVA, A. S.; ZANETTE, R. A.; TOCHETTO, C.; OLIVEIRA, C. B.; SOARES, J. F.; OTTO, M. A.; MONTEIRO, S. G. Parasitismo por *Physaloptera* sp., *Kalicephalus* sp. e *Cryptosporidium* sp. em lagarto (*Tupinambis teguixin*) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Zoociências**, Juiz de Fora, v. 10, n. 3, p. 269-272, 2008d.

SILVA, A. S.; ZANETTE, R. A.; LARA, V. M.; GRESSLER, L. T.; CARREGARO, A. B.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Gastrointestinal parasites of owls

(Strigiformes) kept in captivity in the Southern region of Brazil. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 104, n. 2, p. 485-487, 2009.

SILVA, D. C.; HOMEM, C. G.; NAKAMURA, A. A.; TEIXEIRA, W. F.; PERRI, S. H.; MEIRELES, M. V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 107, n. 2, p. 271-277, 2010.

SIMMONS, G.; HOPE, V.; LEWIS, G.; WHITMORE, J.; GAO, W. Contamination of potable roof-collected rainwater in Auckland, New Zealand. **Water Research**, Lyngby, v. 35, n. 6, p. 1518-1524, 2001.

SIMPSON, A. G. B.; ROGER, A. J. Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. **Current Biology**, London, v. 12, p. 691-693, 2002.

SIVAGANESAN, M.; RICE, E. W.; MARIÑAS, B. J. A Bayesian method of estimating kinetic parameters for the inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide and ozone. **Water Research**, Lyngby, v. 37, n. 18, p. 4533-4543, 2003.

SIVAGANESAN, M.; SIVAGANESAN, S. Effect of lot variability on ultraviolet radiation inactivation kinetics of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 1 n. 39, p. 4166-4171, 2005.

SIVAGANESAN, M.; MARIÑAS, B. J. Development of a Ct equation taking into consideration the effect of lot variability on the inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone. **Water Research**, Lyngby, v. 39, n. 11, p. 2429-2437, 2005.

SMITH, H. V.; ROBERTSON, L. J.; ONGERTH, J. E. Cryptosporidiosis and giardiasis, the impact of waterborn transmission. Journal of Water Supply. **Research and Technology – AQUA**, London, v. 44, p. 258-274, 1995.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B.; GRIMASON, A. M. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. **Trends in Parasitology**, London, v. 21, p. 133-142, 2005.

SMITH, H. V.; CACCIÒ, S. M.; TAIT, A.; MCLAUCHLIN, J.; THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the abiotic transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, London, v. 22, p. 160-166, 2006.

SMITH, H. V.; NICHOLS, R. A. B. *Cryptosporidium*: Detection in water and food. **Experimental Parasitology**, London, v. 124, p. 61-79, 2010.

SMITH, R. P.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; CHENEY, T.; GILES, M. Prevalence and molecular typing of *Cryptosporidium* in dairy cattle in England and Wales and examination of potential on-farm transmission routes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 29, n. 204, p. 111-119, 2014.

SLAPETA, J. Tree of life web project. Disponível em: <<http://tolweb.org/Apicomplexa/2446>>. Acesso em: 10/08/2011.

SLAVIN, D. *Cryptosporisium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 65, p. 262-266, 1955.

SOARES, F. J.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; SILVA, M. K.; MARISCANO, G.; SALOMÃO, E. L.; MONTEIRO, S. G. Parasitismo por *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em *Coendou villosus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 548-550, 2008.

SOLTANE, R.; GUYOT, K.; DEI-CAS, E.; AYADI, A. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporidae) in seven species of farm animals in Tunisia. **Parasite**, Les Ulis, v. 14, p. 335-338, 2007.

SPANNO, F.; CRISANTI, A. *Cryptosporidium parvum*: the secrets of the small genome. **International Journal of Parasitology**, Parkville, v. 30, p. 553-565, 2000.

STALEY, C.; RECKHOW, K. H.; LUKASIK, J.; HARWOOD, V. J. Assessment of sources of human pathogens and fecal contamination in a Florida freshwater lake. **Water Research**, Lyngby, v. 1, n. 46, p. 5799-5812, 2012.

STARKEY, S. R.; JOHNSON, A. L.; ZIEGLER, P. E.; MOHAMMED, H. O. An outbreak of cryptosporidiosis among alpaca crias and their human caregivers. **Journal of American Veterinary Medical Association**, New York, v. 231, p. 1562-1567, 2007.

STRIEPEN, B. Time to tackle cryptosporidiosis. **Nature**, New York, v. 503. p. 190-191, 2013.

STUART, P.; GOLDEN, O.; ZINTL, A.; DE WAAL, T.; MULCAHY, G.; MCCARTHY, E.; LAWTON, C. A coprological survey of parasites of wild carnivores in Ireland. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 112, n. 10, p. 3587-3593, 2013.

SULAIMAN, I. M.; HIRA, P. R.; AL-ALI, F. M.; AL-SHELAHI, F. A.; SHWEIKI, H. M.; IQBAL, J.; KHALID, N.; XIAO, L. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 2805-2809, 2005.

SULLIVAN, J.; JOYCE, P. Model Selection in Phylogenetics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 36, p. 445-466, 2005.

SZONYI, B.; WADE, S. E.; MOHAMMED, H. O. Temporal and spatial dynamics of *Cryptosporidium parvum* infection on dairy farms in the New York City Watershed: a cluster analysis based on crude and Bayesian risk estimates. **International Journal of Health Geographics**, London, v. 17, p. 9-31, 2010.

SZONYI, B.; BORDONARO, R.; WADE, S. E.; MOHAMMED, H. O. Seasonal variation in the prevalence and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* infection in dairy cattle in the New York City Watershed. **Parasitology Research**, Springer Berlin, v. 107, n. 2, p. 317-325, 2010.



TAGUCHI, T.; SHINOZAKI, Y.; TAKEYAMA, H.; HARAGUCHI, S.; YOSHINO, M.; KANEKO, M.; ISHIMORI, Y.; MATSUNAGA, T. Direct counting of *Cryptosporidium parvum* oocysts using fluorescence in situ hybridization on a membrane filter. **Journal of Microbiological Methods**, Columbia, v. 67, n. 2, p. 373-80, 2006.

TAMBURRINI, A.; POZIO, E. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal for Parasitology**, Parkville, v. 29, p. 711-715, 1999.

TRAVERSA, D.; IORIO, R.; OTRANTO, D.; MODRY, D.; SLAPETA, J. *Cryptosporidium* from tortoises: genetic characterization, phylogeny and zoonotic implications. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 22, p. 122-128, 2008.

TEM-HOVE, R.; SCHUURMAN, T.; KOOISTRA, M.; MÖLLER, L.; VAN LIESHOUT, L.; VERWEIJ, J.J. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 13, n. 10, p. 1001-1007, 2007.

TENTER, A. M.; BARTA, J. R.; BEVERIDGE, I.; DUSZYNSKI, D. W.; MEHLHORN, H.; MORRISON, D. A.; THOMPSON, R. C. A.; CONRAD, P. A. The conceptual basis for new classification of the coccidian. **International Journal for Parasitology**, London, v. 32, p. 595-616, 2002.

THOMPSON, R. C.; OLSON, M. E.; ZHU, G.; ENOMOTO, S.; ABRAHAMSEN, M. S.; HIJJAWI, N. S. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. **Advances in Parasitology**, Orlando, v. 59, p. 77-162, 2005.

THURMAN, R.; FAULKNER, B.; VEAL, D.; CRAMER, G.; MEIKLEJOHN, M. Water quality in rural Australia. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 84, n. 4, p. 627-632, 1998.

TIZZER, A. A. A Sporozoan found in the peptides glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, London, v. 5, p. 12-13, 1907.

TIZZER, A. A. An extracellular coccidium: *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of International Medical Research**, New York, v. 18, p. 487-509, 1910.

TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in animals and humans. **Microbiological Reviews**, Maryland, v. 47, n. 1, p. 84-96, 1983.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, London, v. 4, p. 1047-1058, 2004.

TZIPORI, S.; WIDMER, G. A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. **Trends in Parasitology**, London, v. 24, n. 4, p. 184-189, 2008.

TWOMEY, D. F.; BARLOW, A. M.; BELL, S.; CHALMERS, R. M.; ELWIN, K.; GILES, M.; HIGGINS, R. J.; ROBINSON, G.; STRINGER, R. M. Cryptosporidiosis in two

alpaca (*Lama pacos*) holdings in the South-West of England. **The Veterinary Journal**, London, v. 175, p. 419-422, 2008.

VAN, Z.; LANGHOUT, M.; REED, P.; FOX, M. Validation of multiple diagnostic techniques to detect *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. in free-ranging western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) and observations on the prevalence of these protozoan infections in two populations in Gabon. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v. 41, n. 2, p. 210-217, 2010.

VAN de PEER, Y.; De WACHTER, R. Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. **Journal of Molecular Evolution**, Springer Berlin, v. 45, p. 619-630, 1997.

VAN DYKE, M. I.; ONG, C. S.; PRYSTAJECKY, N. A.; ISAAC-RENTON, J. L.; HUCK, P. M. Identifying host sources, human health risk and indicators of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a Canadian watershed influenced by urban and rural activities. **Journal of Water and Health**, London, v. 10, n. 2, p. 311-323, 2012.

VENTURINI, L.; BACIGALUPE, D.; BASSO, W.; UNZAGA, J. M.; VENTURINI, M. C.; MORÉ, G. *Cryptosporidium parvum* em animais domésticos y em monos de um zoológico. **Parasitología Latinoamericana**, Santiago, v. 61, p. 90-93, 2006.

XIAO, L.; MORGAN, U. M.; LIMOR, J.; ESCALANTE, A.; ARROWOOD, M.; SHULAW, W.; THOMPSON, R. C.; FAYER, R.; LAL, A. A. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3386-3391, 1999.

XIAO, L.; MORGAN, U.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A.; LAL, A. A. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 7, p. 287-292, 2000.

XIAO, L.; BERN, C.; LIMOR, J.; SULAIMAN, I.; ROBERTS, J.; CHECKLEY, W.; CABRERA, L.; GILMAN, R. H.; LAL, A. A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. **Journal of infectious Diseases**, Oxford, v. 183, p. 492-497, 2001.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U. UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, p. 72-97, 2004.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis In: ORTEGA, Y. R. **Foodborne Parasites**. Springer: US, 2006, p. 108.

XIAO, L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. **Experimental Parasitology**, London, v. 124, p. 80-89, 2004.

XIAO, S.; AN, W.; CHEN, Z.; ZHANG, D.; YU, J.; YANG, M. The burden of drinking water-associated cryptosporidiosis in China: the large contribution of the immunodeficient population identified by quantitative microbial risk assessment. **Water Research**, Lyngby, v. 46, p. 4272-4280, 2012.

XU, P.; WIDMER, G.; WANG, Y.; OZAKI, L. S.; ALVES, J. M. SERRANO, M. G.; PUIU, D.; MANQUE, P.; AKIYOSHI, D.; MACKEY, A. J.; PEARSON, W. R.; DEAR, P. H.; BANKIER, A. T.; PETERSON, D. L.; ABRAHAMSEN, M. S.; KAPUR, V.; TZIPORI, S.; BUCK, G. A. The genome of *Cryptosporidium hominis*. **Nature**, New York, v. 431, p. 1107-1112, 2004.

YANG, S.; HEALEY, M. C.; DU, C.; ZHANG, J. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in bovine fallopian tube epithelial cells. **Infectious Immunology**, Washington, v. 64, p. 349, 1996.

YANG, R.; FENWICK, S.; POTTER, A.; NG, J. RYAN, U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes in kangaroos from Western Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.179, p. 22-27, 2011.

WALDRON, L. S.; FERRARI, B. C.; GILLINGS, M. R.; POWER, M. L. Terminal restriction fragment length polymorphism for identification of *Cryptosporidium* species in human feces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 1, p 108-112, 2009.

WHO. Water-related diseases. Water Sanitation and Health (WSH). World Health Organization; 2008.

WHO; UNICEF. Progress on drinking water and sanitation. Joint Monitoring Programme update 2014, mai., 2014.

WANG, R.; JIAN, F.; SUN, Y.; HU, Q.; ZHU, J.; WANG, F.; NING, C.; ZHANG, L.; XIAO, L. Large-scale survey of *Cryptosporidium* spp. in chickens and Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) in Henan, China: prevalence and molecular characterization. **Avian Pathology**, London, v. 39, n. 6, p. 447-451, 2010.

WANG, R.; QI, M.; JINGJING, Z.; SUN, D.; NING, C.; ZHAO, JF.; ZHANG, L.; XIAO, L. Prevalence of *Cryptosporidium baileyi* in ostriches (*Struthio camelus*) in Zhengzhou, China. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, p. 151-154, 2011.

WANG, R.; WANG, F.; ZHAO, J.; QI, M; NING, C.; ZHANG, L.; XIAO, L. *Cryptosporidium* spp. in quails (*Coturnix coturnix japonica*) in Henan, China: molecular characterization and public health significance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 6, n. 187, p. 534-537, 2012.

WIDERSTRÖM, M.; SCHÖNNING, C.; LILJA, M.; LEBBAD, M.; LJUNG, T.; ALLESTAM, G.; FERM, M.; BJÖRKHOLM, B.; HANSEN, A.; HILTULA, J.; LANGMARK, J.; LÖFDAHL, M.; OMBERG, M.; REUTERWALL, C.; SAMUELSSON, E.; WIDGREN, K.; WALLENSTEN, A.; LINDH, J. Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. **Emerging Infectious Diseases Journal**, Atlanta, v. 20, n. 4, p. 581-589, 2014.

ZAVVAR, M.; SADRAEI, J.; EMADI, H.; PIRESTANI, M. The use of a nested PCR-RFLP technique, based on the parasite's 18S ribosomal RNA, to characterise *Cryptosporidium* isolates from HIV/AIDS patients. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 102, n. 7, p. 597-601, 2008.

ZHU, G.; KEITHLY, J. S.; PHILIPPE, H. What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Montreal, v. 50, p 1673-1681, 2000.

ZHU, G.; MARCHEWKA, M. J.; KEITHLY, J. S. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. **Microbiology-Uk**, London, v. 146, p 315-321, 2000.

ZINTL, A.; PROCTOR, A.F.; READ, C.; DEWAAL, T.; SHANAGHY, N.; FANNING, S.; MULCAHY, G. The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 137, p 270-277, 2009.

## ANEXOS

### ANEXO A

#### **COLORAÇÃO DE *Ziehl-Neelsen modificada* (ZN)**

1. Fazer esfregão de fezes e deixar secar.
2. Fixar com metanol por 5 minutos
3. Corar com Fucsina de Ziehl por 20 minutos
4. Descorar com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2%) por 30 segundos
5. Lavar bem com água destilada
6. Contra corar com verde de malaquita 5 % por 60 segundos
7. Lavar bem com água destilada
8. Deixar secar
9. Leitura das lâminas em microscópio ótico de luz branca, primeiro em 400X e em caso de suspeita observar sob imersão em 1000X.

### ANEXO B

#### **PREPARAÇÃO DE FEZES PARA EXTRAÇÃO DE DNA EM NaCl**

- 1. Sedimentação das fezes**
  - a) Diluir aproximadamente 1-2 g de fezes em 10 mL de água destilada
  - b) Filtrar em gaze dobrada em 4, transferindo para tubo cônico de 50 mL.  
“Lavar” a gaze com mais água destilada, coletando no próprio tubo cônico.
  - c) Completar volume para 40 mL.
  - d) Centrifugar a 4000 g por 20 minutos, descartar sobrenadante deixando 5 mL.
- 2. Estoque do sedimento (sem purificação) para extração de DNA**
  - a) Transferir 0,5 mL de sedimento para tubo de 1,5mL, identificar e congelar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$
  - b) Transferir 1 mL de sedimento para tubo de 1,5mL, identificar e estocar congelar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$
- 3. Purificação do sedimento para extração de DNA**
  - a) Colocar, em um tubo cônico de 15 mL, 10 mL de solução saturada de NaCl ( $d=1,18$ ).
  - b) Adicionar 1 mL de sedimento fecal. Fechar o tubo e inverter 2 vezes para homogeneizar.
  - c) Sobrepor cuidadosamente 1 mL de água destilada gelada (pingar lentamente, encostando a pipeta na parede do tubo para minimizar distúrbio)
  - d) Centrifugar a 2300 g por 10 minutos.
  - e) Recuperar a camada entre a água destilada e a solução de NaCl, passando-a para outro tubo de 15 mL.
  - f) Adicionar 10-12 mL de PBS e centrifugar a 2300 g por 10 minutos. Colocar novamente 10-12 mL de PBS e repetir a centrifugação.
  - g) Descartar sobrenadante.
  - h) Transferir o sedimento ( $\pm 1\text{ mL}$ ) para tubo de 1,5 mL
  - i) Centrifugar 5000 g por 5-10 minutos e descartar sobrenadante, deixando o mínimo de volume possível no tubo
  - j) Estocar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$

## ANEXO C

### PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE *Cryptosporidium* – CHARGESWITCH® gDNA MINI TISSUE KIT (INVITROGEN™)

#### PRIMEIRA ETAPA:

Para rompimento da parede do oocisto de *Cryptosporidium* sp.:

Acrescentar 1 mL de tampão de lise do kit na amostra, submetendo-a à 15 ciclos de congelamento (- 80 °C) e descongelamento (55 °C).

#### SEGUNDA ETAPA: PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- a) Acrescentar 20 uL de proteinase K
- b) Agitar brevemente o tubo
- c) Colocar parafilm nas tampas dos tubos
- d) Incubar as amostras a 55 °C por 2 horas em banho-maria
- e) Retirar do banho-maria
- f) Acrescentar 10 uL de RNase A
- g) Inverter o tubo cuidadosamente para homogeneização da amostra
- h) Incubar em temperatura ambiente por 2 minutos

#### TERCEIRA ETAPA: LIGANDO O DNA

- a) Suspender as esferas magnéticas no agitador
- b) Acrescentar 120 µL da suspensão na amostra
- c) Homogeneizar gentilmente com a pipeta 5 vezes
- d) Acrescentar 100 µL L de tampão de purificação
- e) Homogeneizar gentilmente com a pipeta por 10 vezes
- f) Posicionar os tubos na estante magnética por 2 minutos
- g) remover o sobrenadante cuidadosamente e descartá-lo

#### QUARTA ETAPA: LAVANDO AS ESFERAS CONTENDO DNA

- a) Remover os tubos da estante magnética
- b) Acrescentar 1 mL de tampão de lavagem do kit
- c) Homogeneizar gentilmente 2 vezes com a pipeta para suspender as esferas magnéticas
- d) Posicionar os tubos na estante magnética por 1 minuto ou até o clareamento da amostra
- e) Remover o sobrenadante cuidadosamente e descartá-lo
- f) Repetir os passos de (a) a (e), na sequência, mais uma vez.

#### QUINTA ETAPA: ELUINDO O DNA

- a) Remover os tubos da estante magnética
- b) Acrescentar 250 µL de tampão de eluição
- c) Homogeneizar gentilmente 2 vezes com a pipeta para suspender as esferas magnéticas
- d) Colocar parafilm na tampa dos tubos
- e) Incubar o material a 55 °C por 5 minutos em banho-maria
- f) Posicionar os tubos na estante magnética por 2 minutos
- g) Remover a solução eluída contendo o DNA purificado cuidadosamente e transferir o eluato para um tubo de 600 µL.

## ANEXO D

### ELETROFORESE EM POLIACRILAMIDA – DNA

#### Materiais

1) Solução de acrilamida/bisacrilamida (19:1) 40%

Acrilamida	.....	7,6 g	.....	15,2 g
Bisacrilamida	.....	0,4 g	.....	0,8 g
H <sub>2</sub> O qsp	.....	20 mL	.....	40 mL

➤ Dissolver em H<sub>2</sub>O a 37°C, filtrar em papel de filtro e acondicionar em frasco âmbar a 4° C por até 30 dias. **ATENÇÃO:** ACRILAMIDA É TÓXICA, NÃO ASPIRAR, USAR MÁSCARA E LUVAS

1) Tampão TBE 5 X

Tris Base	.....	54 g	.....	27 g
Boric Acid	.....	27.5 g	.....	13,75 g
EDTA 0.5 M (8.0)	.....	20 mL	.....	10 mL (ou 12,5 mL de EDTA 0,4 M em 500 mL solução)
H <sub>2</sub> O qsp	.....	1000 mL	.....	500 mL

2) Tampão TBE 1X de corrida

Fazer a diluição 1:5: 100 mL TBE 5 X + 400 mL H<sub>2</sub>O

3) Suporte de vidro para o gel e cuba de eletroforese vertical

Montar as duas placas de vidro fora da cuba, usando o espaçador na extremidade inferior e nas laterais. A utilização de vaselina líquida nos espaçadores melhora a adesão e a vedação. Prender com os grampos.

4) TEMED – solução pronta

5) Persulfato de amônio 20%

Persulfato de amônio	.....	2 g	.....	1 g
H <sub>2</sub> O qsp	.....	10 mL	.....	5 mL

#### Preparo do gel a 5% (cuba permatron maior)

	5,0%	5,5%	6,0%
Solução acrilamida bis 40%	.....	2,5 mL	.....
H <sub>2</sub> O qsp	.....	20 mL	.....
TBE 5 X	.....	4 mL	.....

#### Cuba pequena:

	5,0%	5,5%	6,0%
Acrilam/bis 40%	----- 1,9 mL -----	2,1mL -----	2,25mL
TBE 5X	----- 3 mL -----	3 mL-----	3 mL
H <sub>2</sub> O qsp	----- 15 mL-----	15 mL -----	15 mL

**TEMED: 10 µL**

**Persulfato de amônio: 100-200 µL**

- Homogeneizar a solução
- Acrescentar **10 µL de TEMED** e **100 µL de persulfato de amônio 20%**
- Homogeneizar e verter no suporte de vidro do gel, previamente montado
- Encaixar o pente, inclinando-o levemente para evitar bolhas

**ATENÇÃO: SE O GEL ESTIVER NA HORIZONTAL, DESNECESSÁRIO VEDAR A PARTE INFERIOR.**

- Aguardar a polimerização.
- Retirar os 2 espaçadores superiores e em seguida o pente. Lavar delicadamente as canaletas usando ponteiras e micropipetas.
- Retirar os demais grampos, encaixar na cuba de eletroforese, preenchê-la com TBE 1X
- Aplicar as amostras e submeter a corrente de aproximadamente 98 V e  $\pm 20$  mA

## **COLORAÇÃO DE GEL DE POLIACRILAMIDA PELA PRATA**

### **MATERIAL (SEMPRE USAR LUVAS)**

- 1) Solução fixadora  
Etanol ..... 100 mL ..... 5 mL  
Ácido acético ..... 5 mL ..... 250 µL  
H<sub>2</sub>O qsp ..... 1000 mL ..... 50 mL
- 2) Solução de prata – **preparar na hora**  
Nitrato de prata ..... 0,3 g ..... 0,15 g  
Solução fixadora ..... 50 mL ..... 25 mL  
H<sub>2</sub>O qsp ..... 100 mL ..... 50 mL
- 3) Solução reveladora  
NaOH em pastilhas .....  $\pm 6$  g ..... 1,5 g  
Formaldeído ..... 600 µL ..... 150 -200 µL  
H<sub>2</sub>O qsp ..... 200 mL ..... 50 mL  
(Diluir o NaOH na água, esperar esfriar e colocar o formaldeído assim que for usa-la)

### **PROCEDIMENTO (SEMPRE USAR LUVAS)**

- Retirar cuidadosamente o gel do suporte de vidro, primeiro retirando os espaçadores e depois desprendendo os vidros. Soltá-lo do vidro na cuba com solução fixadora.  
**Manter 3 – 15 minutos na solução fixadora.**
- Desprezar a solução fixadora, segurando o gel na cuba. Adicionar solução de prata na cuba, evitando coloca-la diretamente sobre o gel  
**Manter sob agitação, na solução de prata, por 5-7 minutos**
- Retirar a solução de prata (em frasco para posterior descarte). Lavar 2 X, colocando e retirando água destilada da cuba.
- **Colocar solução reveladora**, agitar suavemente até aparecer as bandas.
- Desprezar a solução reveladora e armazenar na solução fixadora.



**Concentrações de Acrilamida Recomendada para Resolução de DNA linear  
dupla fita (condições não–desnaturante)**

Acrilamida* (%)	Tamanho de Fragmentos Separados    pb	Migração de Corante	
		Xileno Cianol	Azul de Bromofenol
3,5	100 –1000	460	100
5,0	80 – 500	260	65
8,0	60 – 400	160	45
12,0	40 – 200	70	20
15,0	25 – 150	60	15
20,0	6 – 100	45	12

\* 19:1 (peso/peso) acrilamida/bis–acrilamida

**Migração de Corante em Gel de Acrilamida em condições desnaturantes**

Acrilamida * (%)	Migração de Corante	
	Xileno Cianol	Azul de Bromofenol
5,0	140	35
6,0	106	26
8,0	75	19
10,0	55	12
20,0	28	8

\*19:1 (peso/peso) acrilamida/bis–acrilamida

## ANEXO E

### **PROTOCOLO QIAquick EXTRAÇÃO DE DNA EM GEL EM MICROCENTRÍFUGA**

#### **NOTAS IMPORTANTES:**

- A cor amarela do tampão QG indica pH menor ou igual a 7,5
- Adicionar etanol (96 a 100%) no tampão PE antes de usar (ver marcação do volume no frasco)
- Isopropanol (100%) em banho Maria a 50°C ou banho seco.
- Todos os passos de centrifugação são realizados a 17.900 g ou 13.000 RPMs em um microcentrífuga tradicional.

#### **PROCEDIMENTO**

1. Excisar o fragmento de DNA o gel de agarose com um bisturi.
2. Pesar o pedaço de gel em um tubo incolor. Adicionar 3 volumes de tampão QG para um volume de gel (por exemplo: 100 mg = 100 µL).

**Se a cor da mistura estiver laranja ou violeta, adicionar 10 µL de 3 M acetato de sódio, pH 5.0 e homogeneizar. A cor da mistura deverá voltar ao amarelo.**

3. Incube a 50 °C por 10 minutos (ou até o gel ficar completamente dissolvido). Para ajudar a dissolver o gel, homogeneizar em um vortex o tubo por 2-3 minutos durante a incubação.

Para géis com concentração maior que 2% aumentar o tempo de incubação.

4. Depois de dissolver o gel completamente, verificar se a cor da mistura é amarela (similar ao tampão QG sem o gel de agarose dissolvido).

**Se a mistura estiver laranja ou violeta. Adicionar 10 µL de 3 M acetato de sódio pH 5.0 e homogeneizar. A cor voltará para o amarelo.**

5. Adicionar um volume de isopropanol para o volume do gel e homogeneizar.
6. Colocar uma coluna QIAquick na microcentrífuga em um tubo de 2 mL fornecido.
7. Para a ligação do DNA aplicar a amostra a coluna QIAquick e centrifugar por 1 minuto. Descartar o sobrenadante e colocar a coluna QIAquick novamente no mesmo tubo.

**O volume máximo da coluna é de 800 µL**

8. Recomenda-se adicionar 0.5 mL de tampão QG a coluna QIAquick e centrifugar por 1 minuto. Descartar o sobrenadante e colocar a coluna novamente no mesmo tubo.

**Este passo é somente requerido quando o DNA for usado para sequenciamento, transcrição in vitro ou microinjeção.**

9. Para lavar adicionar 0,75 mL de tampão PE na coluna QIAquick e centrifugar por 1 minuto. Descartar o sobrenadante e colocar a coluna QIAquick no mesmo tubo.

**Se o DNA for usado para aplicações sensíveis a sal, tais como seqüenciamento, deixe a coluna descansando de 2 a 5 minutos depois da adição do tampão PE, antes da centrifugação.**

10. Centrifugue a coluna em um tubo de 2 mL (fornecido no kit) por 1 minuto.

11. Coloque a coluna QIAquick em um microtubo de 1,5 mL.

12. Ao eluato de DNA, adicionar 50 µL de tampão EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) ou água no centro da membrana do QIAquick e centrifugue a coluna por 1 minuto.

**Alternativamente, para aumentar a concentração de DNA, adicionar 30 µL de tampão de eluição no centro da membrana do QIAquick, deixar a coluna repousar por 1 minuto e em seguida centrifugar por 1 minuto.**

13. Se o DNA purificado for analisado em um gel adicionar um volume de tampão de corrida para 5 volumes de DNA. Misturar a solução e aplicar no gel.

## ANEXO F – Carta de autorização de coleta



Prefeitura Municipal de Curitiba  
Secretaria Municipal do Meio Ambiente  
Departamento de Pesquisa e Conservação da Fauna  
Rua Presidente Faria, s/nº Centro  
Administração do Passeio Público  
80020-290 Curitiba PR  
Tel 41 3350-9937 / 3350-9920 / 3350-9940  
[www.curitiba.pr.gov.br](http://www.curitiba.pr.gov.br)

Curitiba, 25 de julho de 2014.

Declaro para os fins necessários que a aluna de Doutorado do Curso de Microbiologia, Parasitologia e Patologia, do Departamento de Patologia Básica da UFPR, Cláudia Regina Bosa, realizou coletas de material fecal amostrando aves e mamíferos do plantel do Zoológico Municipal de Curitiba no período de março a dezembro de 2011 e também coletou amostras de água dos lagos e recintos no período de janeiro a março de 2012, a fim de pesquisar a presença do protozoário *Cryptosporidium* por meio de técnicas de concentração, coloração e moleculares.

O trabalho realizado seguiu todos os critérios éticos dos protocolos veterinários estabelecidos pelo Departamento de Pesquisa e Conservação da Fauna (MAPCF) da Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SMMA), com total anuência e liberação para a entrada nos recintos dos animais e coleta do material biológico e da água, juntamente com a equipe técnica. Não houve nenhum tipo de procedimento invasivo.

Atenciosamente,

  
Dra. Tereza Cristina Castellano Margarido

Bióloga - Chefe de Divisão de Zoológico  
Depto. de Pesquisa e Conservação da Fauna/SMMA